

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE
HUMAINE ET EXPERIMENTALE

Année 1970-1971

Série E.N°229

T H E S E

P r é s e n t é e

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS.

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Monsieur Jean-Pierre LEBRETON

Chargé de Recherche de l'I.N.S.E.R.M.

LES IMMUNOGLOBULINES DE L'URINE HUMAINE.

Soutenue le :

1971

Jury : M. A. GERMAN

Président.

M. M. GIRARD

M. P. BOURRINET

Examineurs.

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE
HUMAINE ET EXPERIMENTALE

Année 1970-1971

Série E.N°229

T H E S E

P r é s e n t é e

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS.

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Monsieur Jean-Pierre LEBRETON

Chargé de Recherche de l'I.N.S.E.R.M.

LES IMMUNOGLOBULINES DE L'URINE HUMAINE.

Soutenue le :

Jury :	M. A. GERMAN	Président.
	M. M. GIRARD	Examineurs.
	M. P. BOURRINET	



TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	1
BIOCHIMIE DES PROTEINES URINAIRES ET MECANISME DE LA PROTEINURIE	3
BIOCHIMIE DES IMMUNOGLOBULINES	10
METABOLISME DES IMMUNOGLOBULINES	20
TECHNIQUES :	
A/ TECHNIQUES ANALYTIQUES	29
1°) Immuno-électrophorèse	29
2°) Double diffusion en deux dimensions: Méthode d'Ouchterlony	31
3°) Electrophorèse en gel d'agar	31
4°) Electrophorèse en gel d'amidon ...	32
5°) Electrophorèse en gel de poly- acrylamide	33
6°) Immuno-diffusion radiaire simple en deux dimensions.....	35
7°) Dosage des protéines.....	38
8°) Concentration de l'urine et des solutions protéiques	39
B/ TECHNIQUES PREPARATIVES DES PROTEINES	41
1°) Précipitation par les sels neutres	41
2°) Chromatographie sur résines échangeuses d'ions	41

3°) Gel filtration	44
4°) Electrophorèse préparative	45
5°) Fragmentation des immunoglobulines ...	47
6°) Réduction des immunoglobulines	49
 C/ APPLICATION DES TECHNIQUES PREPARATIVES A LA SEPARATION DES IMMUNOGLOBULINES PLASMATIQUES URINAIRES ET DES PROTEINES "NON IMMUNOGLOBULINES" URINAIRES	 51
 D/ PREPARATION DES IMMUNSERUMS SPECIFIQUES DES IMMUNOGLOBULINES	 54
1°) Animaux	54
2°) Injections et prélèvements	54
3°) Préparation des immun sérums	55
4°) Absorption des immun sérums	56
5°) Conservation des immun sérums	57

PARTIE EXPERIMENTALE :

LES IMMUNOGLOBULINES DE L'URINE DE SUJETS INDEMNES DE MALADIES MALIGNES : MYELOME MULTIPLE DES OS OU MACRO- GLOBULINEMIE	58
 I/ ETUDE QUALITATIVE	58
a) Sujets normaux	58
- Les IgG, fragments et chaînes d'IgG de l'urine normale	58
- Les IgA et IgM de l'urine normale	67
 b) Sujets atteints d'affections rénales	74
Les immunoglobulines dans les atteintes glomérulaires	74
- Les Ig dans la "protéinurie sélective"...	76
- Les Ig dans la "protéinurie non sélective"	80

- Les Ig dans la protéinurie "tubulaire".....	85
Séparation des immunoglobulines de la protéi- nurie tubulaire	91
- Préparation des IgG et des chaînes légères.	92
- Séparation des chaînes légères Kappa des chaînes légères Lambda	94
- Essai de séparation du fragment F'c.....	96

II/ ETUDE QUANTITATIVE 100

Technique utilisée 102

a) Dosage des IgG d'urines de sujets normaux.	108
b) Dosage des IgG et des chaînes légères d' immunoglobulines dans les urines de sujets atteints d'affections rénales diverses ...	111
c) Les immunoglobulines dans les urines des greffes rénales	118

LES IMMUNOGLOBULINES DE L'URINE DE SUJETS ATTEINTS DE MALADIES MALIGNES (MYELOME MULTIPLE DES OS, MALADIE DE WALDENSTROM et MALADIE DITE DES "CHAINES LOURDES ") 129

A/ LES PROTEINES DE BENGE-JONES 129

1°) Etude électrophorétique	130
2°) Etude chromatographique	134
3°) Etude immunologique	136

B/ LES FRAGMENTS ET LES PROTEINES MONOCLONALES ENTIÈRES 141

1°) Les IgG	141
2°) Les autres immunoglobulines	151

C/ LA MALADIE DES CHAINES LOURDES 153

CONCLUSION 158

BIBLIOGRAPHIE 161

I N T R O D U C T I O N

Depuis près de deux siècles qu'une substance thermo-coagulable fut mise en évidence dans l'urine, il n'est guère d'exemples en biologie et clinique humaine qu'un examen, très simple apparemment, ait pu rendre de si éminents services.

Mais, alors même que la recherche de "l'albumine urinaire" devenait un des premiers examens de la clinique en concourant à la classification des atteintes rénales, ses méthodes de détection ne se perfectionnaient guère. Cet apparent paradoxe réside dans le fait que l'urine peut contenir des substances protéiques de nature et d'origine variées ; par là même, l'utilisation de techniques univoques à la détection ou au dosage de substances au comportement chimique ou physicochimique différent ne permet pas toujours de rendre compte fidèlement de la quantité et de la nature exacte des protéines ou des composés apparentés que le rein sain ou malade peut éliminer. Car, cette "albumine", sitôt révélée au biologiste et au clinicien, est en réalité un mélange étonnamment complexe dont la composition est sujette à des variations importantes, non seulement entre des individus dont la pathologie rénale est différente, mais encore parfois chez un même sujet ; car, le rein n'est pas seulement un filtre, mais avant tout une machinerie compliquée qui tamise, concentre, sélectionne, réabsorbe, sécrète, puis élimine les substances contenues dans l'énorme volume de 180 litres de plasma qui le traversent chaque jour. Aussi, pour quelques-unes de ces protéines de l'urine qui nous sont maintenant familières, combien restent à l'heure actuelle mystérieuses.

Parmi celles qui nous sont accessibles, il en est peu qui aient suscité et suscitent encore autant de travail et de

réflexion que les immunoglobulines. Par de multiples aspects, mais en premier lieu pour le rôle essentiel qu'elles jouent dans la défense de l'organisme contre l'agression, elles sont à même d'intéresser toutes les disciplines. Au niveau de leur structure, en particulier, peu de protéines affichent une telle complexité, responsable, sans aucun doute, de leur remarquable efficacité.

Charriées par le plasma sanguin, leur taille est trop importante pour permettre leur passage en quantité appréciable dans l'urine normale. Cependant, aucun mécanisme ne pouvant fonctionner à la perfection, la traversée de la membrane glomérulaire par ces protéines s'effectue en quantité minime. L'on soulignera à cet égard tout le mérite des techniques sensibles que l'immunochimie a apporté dans ces dernières années à la détection de quantités très faibles de protéine.

Nous avons voulu, dans notre travail, apporter quelques éclaircissements à la nature exacte des immunoglobulines et des fragments de celles-ci que l'on retrouve dans l'urine, en nous attachant plus particulièrement, d'une part à celles qui sont rencontrées lors des diverses affections du rein, quel que soit le lieu où réside l'atteinte rénale, d'autre part à la présence des immunoglobulines dans l'urine des sujets atteints de maladies hématologiques malignes.

Après un rappel de la nature, de l'origine, et du mécanisme de passage dans l'urine des protéines actuellement connues, nous soulignerons les traits principaux de la biochimie des immunoglobulines et de leur métabolisme.

Nous décrirons les techniques utilisées, puis nous examinerons sous l'angle qualitatif les diverses immunoglobulines rencontrées dans l'urine normale et celle des atteintes rénales.

Nous donnerons ensuite les résultats quantitatifs obtenus dans ces mêmes atteintes rénales, et nous terminerons par une étude descriptive des immunoglobulines de l'urine dans le myélome multiple des os, la maladie de Waldenström, et les affections malignes apparentées.

BIOCHIMIE DES PROTEINES URINAIRES

et

MECANISME DE LA PROTEINURIE

A/ NATURE ET ORIGINE DES PROTEINES URINAIRES -

Longtemps ignorée, la protéinurie physiologique est un fait maintenant universellement reconnu. Son importance est variable au cours du nycthémère, oscillant autour de 40 à 80 mg/jour, et l'on peut considérer qu'une valeur de 100 mg/jour se trouve à la limite supérieure de la protéinurie physiologique. En pathologie rénale, la protéinurie est encore souvent synonyme d'albuminurie ce qui, lors du syndrome néphrotique, n'est pas un abus de langage car dans ce cas précis, l'albumine représente au moins 80% de la protéinurie. Cependant, l'assimilation de toute protéine excrétée par l'urine, à de l'albumine, est infiniment regrettable, car le terme laisse entendre qu'un seul type de protéine peut être excrété par le rein. En fait, l'avènement des techniques électrophorétiques et immuno-électrophorétiques a facilité la mise en évidence de la plupart des protéines sériques dans l'urine.

La majeure partie des protéines urinaires semble être attribuée à des protéines d'origine plasmatique. Cependant, une certaine confusion persiste pour certaines protéines de faible masse moléculaire : sous le terme de "protéines urinaires", en effet, on fait entrer certaines substances, telles que des polysaccharides acides, qui ne sont pas de nature protéique. SCHULTZE et HEREMANS ont adopté une classification par ordre d'importance de taille moléculaire : les protéines plasmatiques de PM $> 30\ 000$ et les protéines de faible PM.

Un chapitre à part concerne le problème des protéines non plasmatiques, d'origine tissulaire rénale ou non rénale (2,66).

A ce jour, seule l'uromucoïde ou protéine de TAMM et HORSFALL est d'origine véritablement rénale et absente du sérum.

1°) Protéines plasmatiques de PM $\geq$ 30 000 :

L'immuno-électrophorèse a permis la mise en évidence et l'identification de très nombreuses protéines qui apparaissent régulièrement dans l'urine, et qui sont identiques aux protéines plasmatiques correspondantes. Ont été ainsi reconnues : l'albumine, l' α_1 glycoprotéine acide, l' α_1 antitrypsine, α_1 lipoprotéine, α_2 -Zn-glycoprotéine, α_2 -Gc-globuline, transferrine, hémopexine, β_1 E-globuline, les immunoglobulines IgA et IgG, et chaînes légères des immunoglobulines. Ces protéines ont entre elles en commun de posséder un PM inférieur à 200 000 : elles sont mises en évidence dans l'urine physiologique. Les protéines de PM $>$ 200 000 ne sont pas habituellement retrouvées en dehors de l'atteinte du glomérule : ceci est le cas pour les lipoprotéines α_2 et β_1 , et le fibrinogène. Les IgM peuvent se rencontrer dans la maladie de Waldenström ou beaucoup plus rarement dans les affections où leur taux sérique est considérablement augmenté. De même, l' α_2 -macroglobuline ne passe habituellement pas la barrière glomérulaire, chez l'individu normal.

2°) Les protéines de faible PM :

Très nombreuses et en majorité comprises dans les zones α_2 et β de l'électrophorèse, leur origine est souvent mal définie : le problème théorique le plus important étant de savoir si elles proviennent véritablement du plasma. Par l'utilisation d'immunsérum antisérum humain total qui a été produit chez l'animal par injection de sérum ou de plasma humain total, il est possible de détecter dans l'urine normale certaines protéines difficilement mises en évidence dans le sérum humain normal. Il est donc probable que du fait de leur PM bas, ces protéines, dont la clearance est importante, se trouvent dans l'urine à une concentration plus élevée que dans le plasma, et sont ainsi mises aisément en évidence.

SCHULTZE et HEREMANS (143) classent en plusieurs groupes ces protéines de faible PM :

1- Les polysaccharides acides, classés arbitrairement dans ce groupe, car de nature non protéique ;

2- Les glycopeptides de PM inférieur à 15 000, précipitables par fractionnement à l'éthanol entre 50 à 90% : ainsi, le matériel soluble dans l'éthanol à 50% contient 50 à 80% de sucre dont 20 à 26% d'acide sialique. Ces substances sont incapables de réagir vis-à-vis d'un immunosérum humain normal.

3- Les protéines de PM compris entre 15 000 et 30 000, à forte teneur en sucres, et de coefficient de sédimentation de 2 à 2,5S. Des antisérums ont pu être obtenus à partir de certaines de ces protéines, et il semble bien qu'ils soient des constituants universels de tous les liquides biologiques, y compris le plasma. LATERRÉ (84), en étudiant l'urine physiologique, obtient de nombreux arcs de précipitation avec un immunosérum anti-liquide-céphalo rachidien absorbé par du plasma, et GRANT (61) rapporte la présence dans les urines normales d'au moins 12 composants antigéniques non détectables dans le sérum. De même, HALBERT ainsi qu'ANTOINE mettent en évidence dans l'urine, des protéines "non plasmatiques" d'ailleurs non exclusivement dérivées du rein, et réagissant avec des immunosérums anti-protéines rénales ou des immunosérums dirigés contre des organes autres que le rein. C'est donc dans ce groupe comprenant une grande quantité de protéines de mobilité α_2 ou β que l'on retrouve les protéines dont la présence dans le plasma est faible ou qui proviennent d'une destruction tissulaire rénale ou extra rénale.

4- On peut également citer les protéines à activité biologique: hormones telles que les gonadotrophines, l'érythropoïétine, des substances de groupe sanguin, des enzymes telles que l'amylase, la plasmine, l'uropepsine, les estérases α et γ .

MECANISME DE LA PROTEINURIE -

Il est donc possible de considérer qu'en dehors de l'uro-mucoïde sécrété par l'épithélium tubulaire et des protéines d'origine tissulaire rénale ou extra-rénale, il existe dans l'urine à l'état normal, d'une part des protéines connues, par exemple

l'albumine et la sidérophiline dont l'identité aux protéines plasmatiques ne fait pas de doute, et d'autre part des substances de faible PM qui, en fait, circuleraient à l'état de traces dans le plasma. La présence des protéines dans l'urine doit donc s'expliquer en termes de filtration glomérulaire et de réabsorption glomérulaire. Des anomalies de la filtration et de la réabsorption influenceront donc sur les aspects quantitatif et qualitatif de la protéinurie.

La pénétration des protéines plasmatiques à l'intérieur du néphron se fait principalement par filtration glomérulaire. Il n'est pas exclu toutefois, qu'une petite partie des protéines plasmatiques de l'urine normale puisse s'introduire au niveau des tubes collecteurs et jusqu'à la vessie.

La sécrétion des protéines plasmatiques n'a pas été prouvée : les observations histochimiques n'ayant jamais montré de sécrétion protéique et les artifices tels que l'injection d'albumine, l'asphyxie ou l'intoxication par le mercure, qui déclenchent une protéinurie chez les poissons à rein glomérulaire ayant échoué chez les poissons aglomérulaires. Une petite sécrétion tubulaire ne peut cependant être totalement exclue, car lors d'expériences de stop-flow, certains auteurs ont constaté la sécrétion locale de protéines.

1°) La filtration glomérulaire :

a) La théorie du pore considère que les capillaires glomérulaires se comportent comme un filtre. Toute protéine dont la masse moléculaire est égale ou supérieure à 70 000, PM de l'albumine, ne passe pas ce filtre. Cette théorie n'est cependant pas entièrement satisfaisante car l'on a remarqué que des molécules plus petites que l'albumine ont des clearances glomérulaires plus basses que l'inuline. Des expériences entreprises à l'aide de dextrans de différents PM ont montré que l'effet de filtration se manifeste pour des PM supérieurs à 70 000, chez l'homme, d'où l'hypothèse d'une hétérogénéité du diamètre des pores.

b) Dans la théorie de la diffusion, la membrane du capillaire glomérulaire se comporterait comme un gel dont la surface est perméable à l'eau aussi bien qu'aux protéines. Dans ces conditions, toutes les protéines peuvent diffuser à travers la membrane en fonction de leur coefficient de diffusion dans le gel. Pour des

substances de faible PM, le coefficient de diffusion à travers la membrane se trouve proche du coefficient de diffusion dans l'eau. Par contre, pour des molécules de la taille des protéines, le coefficient de diffusion devient très faible, et par conséquent rend négligeable le passage des protéines de forte masse moléculaire.

Cette théorie de la diffusion est séduisante, car elle n'impose pas de limite à la taille des protéines qui peuvent être transférées au travers du glomérule.

Elle expliquerait que, non seulement l'albumine, mais encore des traces de protéines plus lourdes peuvent être retrouvées dans l'urine.

2°) La réabsorption tubulaire :

Etudiée chez l'animal par micro-ponction au travers de la capsule de BOWMANN, la teneur protéique du liquide glomérulaire n'a pu, jusqu'à présent, être déterminée chez l'homme normal.

Chez l'animal, la valeur moyenne obtenue est de 0,50 g/litre. Cependant, à partir des résultats obtenus chez l'animal et au moyen de l'étude expérimentale chez l'homme de la perméabilité glomérulaire aux macromolécules, on considère à l'heure actuelle que cette teneur est proche de 0,20 g/litre.

Le volume de liquide filtré par le rein et par jour étant de 180 litres, on voit que la quantité de protéine qui passe quotidiennement par le rein est d'environ 30 grammes. La réabsorption de ces protéines filtrées, se fait au niveau du tubule proximal, mais les mécanismes enzymatiques qui permettent cette réabsorption, sont inconnus. Cette dernière obéit aux mêmes mécanismes que pour le glucose, ainsi lorsque la concentration des protéines dépasse la capacité maximum de réabsorption tubulaire : T_m , les protéines apparaissent dans l'urine en quantité proportionnelle à leur teneur dans le plasma. On a ainsi mesuré le T_m de l'albumine et de l'hémoglobine. Un problème très controversé est de savoir si cette réabsorption est non sélective, c'est-à-dire si elle intéresse au même titre toutes les protéines, quelle que soit leur taille moléculaire ou bien si cette réabsorption se fait de façon préférentielle sur telle ou telle fraction.

L'hypothèse de la non-sélectivité est la plus défendue actuellement.

L'argument majeur étant que la perfusion d'albumine chez l'homme normal ou chez le néphrotique provoque une protéinurie, cette dernière n'étant pas constituée uniquement par l'albumine, mais également par toutes les globulines. De plus, la clearance de ces fractions globuliniques diminuant proportionnellement à l'augmentation de la clearance de l'albumine lorsqu'on augmente la perfusion d'albumine, la réabsorption des protéines doit être non sélective et compétitive.

Il existerait alors un T_m global de réabsorption des protéines.

L'hypothèse de la non-sélectivité a été mise en doute par certains auteurs qui n'ont pas observé, lors de protéinuries importantes, d'incidence sur l'excrétion et la clearance des protéines de faible PM : la réabsorption serait donc normale pour ces dernières.

En bref, disons qu'il est admis actuellement que cette réabsorption est non-sélective chez le sujet dont les fonctions tubulaires sont intactes. En revanche, si l'on exclut une sécrétion tubulaire de protéines, la réabsorption semble bien sélective dans certaines tubulopathies, congénitales ou non, car l'on constate alors la présence de quantités anormales de protéines par rapport à d'autres.

SCHULTZE et HEREMANS (144) ont proposé une hypothèse qui expliquerait les différents aspects donnés par les protéinuries normales, tubulaires et glomérulaires. Dans ce schéma théorique, ces auteurs tiennent compte d'une part, de l'albumine et d'autre part, des protéines de très faible PM : la concentration plasmatique de l'albumine étant considérée comme 10 000 fois plus élevée que celle des protéines de très faible PM. Toutefois, si l'on admet que le rapport de clearance des deux types de protéine est inverse, c'est-à-dire 10 000 fois plus élevé pour les protéines de faible PM, la concentration glomérulaire, par conséquent, la quantité filtrée journallement pour chaque type de protéine, est la même : $360 \text{ mg} = (\text{volume filtré par jour} : 180) \times (\text{concentration glomérulaire} : 2 \text{ mg/litre})$. Si l'on admet d'autre part que la réabsorption se

fait de façon non sélective et compétitive, et que le T_m est de 1 g/jour, dans ces conditions et pour la protéinurie normale, chaque type de protéine est réabsorbé à 95%, puisque cette réabsorption n'est pas totale et 5% de chaque type de protéine se retrouvent dans l'urine, soit 18 mg pour l'albumine et 18 mg pour les protéines de faible PM : on remarquera ainsi l'importance de l'excrétion des protéines de faible PM.

Dans la protéinurie tubulaire, le mécanisme de filtration reste identique, seul le T_m est diminué de moitié : la réabsorption se faisant à 50% de la quantité filtrée.

Dans ces conditions, 50% et non plus 5% de protéines sont éliminées dans l'urine, mais dans le même rapport que précédemment : 180/180.

Lors de la "protéinurie glomérulaire", dont l'exemple pris ici est celui de la néphrose, les troubles sont au niveau de la filtration : le passage glomérulaire des protéines se trouve fortement augmenté. De ce fait, la quantité totale filtrée par jour est très importante et, comme le T_m reste toujours identique, les capacités de réabsorption sont rapidement débordées : il y a une apparition massive de protéines dans l'urine, dans un rapport de concentration, cette fois très en faveur de l'albumine.

o

o

o

BIOCHIMIE DES IMMUNOGLOBULINES

En 1937, TISELIUS (164) définit les gammaglobulines comme la fraction électrophorétiquement la plus lente des protéines du sérum humain et indique, l'année suivante, que l'on retrouve dans cette fraction l'essentiel de l'activité anticorps. Cependant, cette fraction gamma se révèle comme étant très hétérogène, et ce n'est que quelques vingt années plus tard, grâce à l'utilisation de la technique immuno-électrophorétique, mise au point par GRABAR et WILLIAMS (59,60), et l'emploi de l'ultracentrifugation, que vont s'individualiser successivement les différentes composantes de la zone gamma-globuline. On regroupe actuellement sous le nom d'immunoglobulines, terme faisant appel à la vocation particulière de ces globulines, " des protéines ayant une activité anticorps connue et certaines protéines en relation avec elles par leur structure chimique et leur spécificité antigénique " (103). Dans cette définition " sont comprises les protéines pour lesquelles une activité anticorps n'a pas été démontrée, par exemple les protéines de myélome, les protéines de Bence-Jones, et les sous-unités d'immunoglobulines apparaissant naturellement ". " Elles ne sont pas restreintes au plasma, mais peuvent être trouvées dans d'autres liquides du corps ou des tissus, tels que l'urine, le liquide céphalo-rachidien, les nodules lymphatiques, la rate, etc..."

Cinq classes d'immunoglobulines ont été décrites. Il faut à ce propos souligner l'immense aide qu'ont apporté à l'élaboration de la structure des immunoglobulines, les protéines de myélome ou de maladie de Waldenström: immunoglobulines de mobilité électrique très restreinte, sécrétées abondamment par un clone de lymphocytes ou de plasmocytes.

Nous décrirons succinctement ces protéines par ordre d'importance pondérale :

- Les γ G ou IgG : anciennes γ 7S.

Elles représentent le composant le plus important des immunoglobulines : leur concentration normale, variable dans le sérum humain, oscille entre 8 et 15 g g^{-1} . Elles possèdent une mobilité électrophorétique très hétérogène : en immuno-électrophorèse, l'arc des IgG atteint bien souvent la zone des α_2 . Ce sont également les protéines les plus cathodiques du spectre électrophorétique. Leur masse moléculaire moyenne est de 160 000 avec un $S_{20} = 6,6$.

La plupart des anticorps appartiennent à cette famille d'immunoglobulines, de même qu'une grande partie des "paraprotéines" ou protéines myélomateuses.

- Les γ A ou IgA : anciennes β_2 A.

Découvertes par BURTIN (16), puis étudiées par HEREMANS (73,74), elles sont longtemps passées inaperçues du fait de leur faible importance pondérale : entre 2 à 3 g / litre de sérum chez le sujet normal, et de la difficulté de leur mise en évidence en électrophorèse et en immuno-électrophorèse : elles représentent toutefois un pourcentage appréciable des "paraprotéines". Deux types de molécules IgA sont connues : les unes sont sériques, les autres sont localisées dans les sécrétions.

- Les γ M ou IgM : anciennes β_2 M.

Ces protéines sont présentes en faible quantité dans les sérums normaux : environ 1 g g^{-1} . Toutefois, leur taux est soumis à des variations importantes, en particulier dans la macroglobulinémie de Waldenström, qui a permis l'isolement et l'étude de ces immunoglobulines. Elles forment, avec la macroglobuline α_2 , le constituant lourd du sérum : leur constante de sédimentation est de 19 unités Svedberg. Du fait de leur importante masse moléculaire, elles diffusent très peu lors de l'immuno-électrophorèse, restant très près du réservoir de départ.

- Les γ D ou IgD (137), dont la concentration dans le sérum humain est très faible : environ 30 mg/litre, mais qui peuvent également subir une prolifération monoclonale (138). Deux groupes

d'IgD viennent d'être récemment décrits (130), différant dans leurs propriétés antigéniques. On ignore encore si cette hétérogénéité reflète soit la présence de deux sous-classes, ou bien celle de variantes allotypiques.

- Les γE ou IgE, très récemment, mais encore partiellement étudiées (79), ont une concentration sérique très faible, inférieure à 1 mg/litre. Les anticorps réaginique des malades allergiques appartiennent à cette classe.

Toutes ces immunoglobulines peuvent avoir une activité anticorps, bien que pour l'instant on ne connaisse pas d'activité anticorps sur les IgD, et il est très probable qu'également les "paraprotéines", produits de sécrétion d'un seul type d'immunoglobuline à partir d'un clône lymphocytaire ou plasmocytaire, possèdent une activité anticorps. C'est, en fait, cette dernière activité qui est responsable de l'intérêt considérable qui entoure l'étude des immunoglobulines, tant du point de vue biochimique qu'immunologique, génétique ou physiologique.

Structure des immunoglobulines -

Nous n'étudierons dans cette partie que les traits principaux concernant la structure des immunoglobulines, ne considérant que les classes pondéralement les plus importantes : les IgG, les IgA et les IgM. Les différentes classes d'immunoglobulines se caractérisent par une très grande similitude chimique, bien qu'elles possèdent une variété considérable de spécificité anticorps.

1°) Les immunoglobulines G ont une masse moléculaire d'environ 160 000. Leur teneur en sucres n'est pas supérieure à 3%. Elles sont composées de 4 chaînes polypeptidiques appariées : deux lourdes et deux légères, reliées entre elles par un certain nombre de ponts disulfure réalisés par l'union de deux molécules de cystéine.

Les procédés de réduction chimique et de protéolyse enzymatique ont aidé considérablement à l'approche de l'étude des Ig :

1) La réduction des groupes (S-S) sous l'action d'agents réducteurs provoque la rupture des ponts disulfure et la dissociation en deux variétés de chaînes : les chaînes lourdes et légères,

reliées encore entre elles par un certain nombre de liaisons hydrogène et électrostatique, détruites en milieu acide. La solubilité de ces chaînes étant conservée, il est alors possible de les séparer et de les étudier par gel-filtration.

Le nombre et la position des ponts disulfure ont un rôle important dans la structure des immunoglobulines : il existe environ 15 à 20 ponts disulfure dans une molécule de γG , dont certains constituent des ponts intracaténaux, sur une même chaîne polypeptidique ; ils réalisent ainsi des boucles de 56 acides aminés. Il y a quatre boucles par chaîne lourde, et deux par chaîne légère. Les ponts intercaténaux unissent les chaînes légères aux chaînes lourdes et, également, les chaînes lourdes entre-elles. Pour chaque sous-classe d'IgG, le mode de liaison chaîne lourde-chaîne légère, de même que le nombre de ponts disulfure interchaîne lourde, sont spécifiques. Ainsi, alors que le pont disulfure reliant la chaîne lourde et la chaîne légère de la sous-classe IgG₁ est adjacent des ponts disulfure interchaîne lourde, il en est éloigné de près de 90 résidus dans les sous-classes IgG₂, IgG₃, IgG₄. Les ponts interchaîne-lourde se trouvent rassemblés aux environs du milieu de la chaîne lourde, (région charnière des IgG) : l'on en compte respectivement deux pour les IgG₁ et les IgG₄, quatre pour les IgG₂ et cinq pour les IgG₃.

Il est, dès maintenant, important de remarquer que la longueur de la chaîne lourde est d'environ 446 résidus (30) et celle de la chaîne légère d'environ 214 résidus. Chaque chaîne est spécifique d'une espèce moléculaire : γ pour les γG , α pour les IgA, μ pour les IgM, alors que les chaînes légères sont communes à toutes les classes.

2) Une seconde voie d'approche de l'étude des immunoglobulines est le clivage enzymatique (118,119).

La papaïne en présence de cystéine réalise une protéolyse limitée de la molécule en trois fragments :

- deux fragments Fab (anciennement S = slow en raison de leur emplacement électrophorétique) de l'anglais : fragment antigen binding, de PM = 55 000. Le fragment Fab porte un site de

combinaison avec l'antigène : comme il y a deux fragments Fab, il y a donc deux sites de combinaison avec l'antigène dans une molécule d'IgG. Lorsque l'on prépare le fragment Fab, il devient univalent, mais conserve sa spécificité vis-à-vis de l'antigène. Ce fragment Fab peut, lui-même, par réduction, donner naissance d'une part à une chaîne légère, d'autre part à un fragment de la chaîne lourde appelé Fd. Le fragment Fab correspond donc à une extrémité de la structure primaire de l'immunoglobuline, comprenant une chaîne légère et une partie de la chaîne lourde : ceci implique évidemment qu'au moins une liaison covalente disulfure maintient chaîne lourde et légère.

- un fragment Fc : PM = 50 000 = fragment cristallisable (anciennement : F = fast en raison de sa mobilité électrophorétique), sans communauté antigénique avec le fragment Fab. Le fait que le fragment Fc soit cristallisable est en faveur d'une structure uniforme dans la plupart des molécules d'IgG.

La fragmentation par la pepsine (102) permet d'obtenir un fragment : le $F(ab')_2$, de PM environ 100 000, correspondant à la liaison des deux Fab. En revanche, le fragment Fc est détruit sous l'action de la pepsine. Le $F(ab')_2$ peut, lui-même, par réduction, être clivé en deux fragments $F(a'b')$, très semblables aux fragments Fab, et capables de se recombinaison en anticorps bivalent.

Un troisième type de fragment appelé le F'c, peut également être obtenu sous l'action de la papaïne + cystéine et également de la pepsine. On a montré (78) que le F'c papaïne et le F'c pepsine ne différaient entre-eux que par leur longueur respective en acides aminés. Ils correspondent aux premiers 116 acides aminés terminaux pour le F'c pepsine et aux 92 acides aminés terminaux pour le F'c papaïne, de la partie C-terminale de la chaîne lourde.

Structure primaire et hétérogénéité antigénique des immunoglobulines IgG -

Nous nous attacherons à l'étude des IgG qui sont les protéines actuellement les mieux connues.

a) Les chaînes légères :

Les données actuelles attribuent à la chaîne légère un PM d'environ 25 000. Elle est composée de 214 à 221 acides aminés. Quatre molécules de systéine réalisent deux ponts disulfure formant deux "loops" ou boucles, une en partie N-terminale, le pont disulfure reliant les acides aminés 23 et 88, le deuxième en partie C-terminale reliant les acides aminés 134 et 194. La chaîne légère peut être, elle-même, divisée en une partie variable (VL) correspondant exactement à la moitié de la chaîne : 107 pour la protéine Ag étudiée par PUTNAM (123), et une partie constante (CL). La partie variable est sujette à des variations importantes d'une chaîne légère à une autre : cette variabilité est causée par des échanges multiples d'acides aminés et quelques délétions dans la moitié N-terminale. La partie constante est remarquable par les identités de séquence dans la moitié C-terminale des chaînes légères de même type antigénique : deux types antigéniques majeurs de chaînes légères, appelés μ et λ (81) ont été décrits, basés sur des différences de structure de la partie constante de la chaîne légère : ces deux types de chaînes légères, présents chez tout individu, sont appelés des isotypes. Ces spécificités isotypiques sont celles qui sont homogènes dans tous les individus d'une espèce animale (109,110,111). MANNICK et KUNKEL (93) ont montré que les IgG normales sont constituées d'immunoglobulines des deux types, et que 2/3 environ des IgG sont de type Kappa et 1/3 de type Lambda. Nous verrons que l'on connaît également des isotypes au niveau des chaînes lourdes : γG_1 , γG_2 , γG_3 , γG_4 .

Un second exemple d'isotypie est connu à l'intérieur des chaînes légères λ : il concerne les types OZ+ et OZ- (32) mis en évidence au moyen d'une réaction de précipitation en gel. Les protéines OZ+ ont une arginine en 190 et les protéines OZ- une lysine. Le tripeptide (OZ+) est : (SER.HIS.ARG) et le tripeptide (OZ-) : (SER.HIS.LYS) ; mais tout individu possède des molécules OZ+ et OZ-, comme il possède des molécules μ et λ . Cependant, chacune de ces classes porte également des spécificités propres à certains individus : ce polymorphisme d'un même type de protéine, à l'intérieur d'une espèce, a pour nom : l'allotypie. Ces structures particulières sont génétiquement déterminées : ainsi connaît-on, au niveau des chaînes légères μ , des groupes définis par une réaction d'inhibition d'agglutination : le système Inv comprend trois facteurs : Inv(1),

Inv(2) et Inv(3), détectable seulement au niveau des chaînes légères κ (135,154). Un interchange valine-leucine dans la partie constante en position 191 est responsable des caractères Inv(1) et Inv(3). Lorsque la valine occupe la position 191, la chaîne légère κ est Inv(3), quand il s'agit de la leucine, la chaîne légère est Inv(1).

On tend actuellement à classer les chaînes légères en sous-groupes sur la base de leur homologie chimique. Pour les chaînes légères de type κ , trois sous-groupes sont actuellement individualisés. Ils correspondent, à l'intérieur des parties variables, à des échanges spécifiques d'acides aminés par rapport à une séquence hypothétique de base, déterminée par la présence de résidus identiques dans deux groupes. D'autre part, on a pu montrer récemment (100) que l'échange : valine-leucine, responsable de l'expression du marqueur génétique Inv, est retrouvé dans les trois sous-groupes. De la même façon, quatre sous-groupes ont été définis dans les chaînes légères λ . Dans les sous-groupes I et II, l'acide aminé N-terminal est un résidu α -glutamique, cyclisé en α -pyrrolidone carboxylique ; dans le sous-groupe IV, l'acide aminé N-terminal est une tyrosine ; un échange (SER-GLY) dans la partie constante (154) est également remarquable dans le sous-groupe IV.

b) Les chaînes lourdes :

Le PM moyen des chaînes lourdes d'IgG est d'environ 55 000 : dans la protéine (EU) (30), 446 acides aminés, constituent la chaîne lourde. Pour chaque chaîne, il existe 11 cystéines réalisant 4 ponts disulfure intra-chaîne lourde, 2 ponts disulfure inter-chaîne lourde, et un pont disulfure inter-chaîne lourde et légère. De même que pour les chaînes légères, on connaît depuis 1964 (63,160) à l'intérieur de la classe des IgG, des sous-classes présentes chez tout individu : il s'agit là, comme pour les chaînes légères κ et λ , d'isotypes présents chez tout individu normal. Ces sous-classes ont pu être mises en évidence au moyen de réactions de précipitation en milieu gélifié : immuno-électrophorèse ou immuno-diffusion, et en utilisant soit des antisérums préparés chez le singe à partir d'IgG normales (160), soit des antisérums préparés à partir de protéines myélomateuses. L'importance relative des sous-classes est évaluée indirectement, d'après la fréquence des protéines myélomateuses qui s'y rattachent immunologiquement.

Quatre sous-classes sont actuellement décrites : γG_1 (We, $\gamma 2b$), γG_2 (Ne, $\gamma 2a$), γG_3 (Vi, $\gamma 2c$), γG_4 (Ge, $\gamma 2d$), représentant pour les γG_1 : 77%, γG_2 : 11%, γG_3 : 9%, γG_4 : 3% du total des γG . L'étude chimique de ces sous-classes (62) par la technique des "peptide maps" montre que 75 à 90% des spots sont en commun dans toutes les sous-classes : seules les γG_4 possèdent le plus grand nombre de peptides spécifiques de sous-classe.

Comme pour les chaînes légères κ , on trouve au niveau de chacune de ces classes de chaînes γ , des spécificités antigéniques particulières : les facteurs Gm qui sont détectés dans les IgG au moyen d'une réaction d'inhibition d'agglutination (131). On connaît actuellement quelques 24 facteurs Gm transmis génétiquement et dont la localisation a été déterminée. C'est ainsi que le Gm(1), le Gm(2), le Gm(8) sont portés par le fragment Fc des γG_1 , le Gm(5) et le Gm(21) par le Fc des γG_3 : il existe ainsi une relation étroite entre isotypes et allotypes. D'autres facteurs, comme le Gm(4) et le Gm(17) sont portés par le fragment Fd des γG_1 : de plus, certains de ces facteurs, tels le Gm(4) et le Gm(17), portés par le fragment Fd, nécessitent la présence de la chaîne légère, donc du Fab pour s'exprimer : ce qui met l'accent sur l'importance de la configuration quaternaire dans l'expression sérologique de certains des facteurs Gm (113). On ne connaît pas, en revanche, de facteurs portés par les γG_4 . FRANGIONE (50) a établi la séquence d'un pentapeptide qui apparaît dans les molécules Gm(1) et non dans les molécules Gm(-1) : dans les molécules Gm(1) ou Gm(a), la séquence est : (-Asp-Glu-Leu-Thr-Lys). Elle est (Glu-Glu-Met-Thr-Lys) pour le Gm(-1) ou Gm(-a) : ce dernier peptide appelé (non a), est retrouvé également dans les sous-groupes : γG_1 , γG_2 et γG_3 , mais non dans les γG_4 . Le peptide (non a) apparaît se comporter comme une séquence de base, à l'intérieur de laquelle des échanges spécifiques d'acides aminés conduisent au Gm(a) ou Gm(1) : il en est de même pour un second marqueur génétique : (non g) trouvé dans les sous-groupes γG_3 , dont la modification conduit au marqueur génétique Gm(g) ou Gm(21) : le (non g) est retrouvé également dans les protéines γG_2 (101).

De même que pour les chaînes légères, les chaînes lourdes comportent une partie variable et une partie constante (121). La partie variable de la protéine Eu a au moins 114 résidus, alors que

pour une autre protéine : He, elle est de 118. Il semble que, comme pour les chaînes légères, il existe des sous-groupes de chaînes lourdes : on en connaît actuellement deux : ainsi, deux protéines du même sous-groupe ont dans leur région variable, 59% de leurs acides aminés identiques, alors que deux protéines de sous-groupes différents n'ont en commun que 27% d'acides-amino-acides semblables (26).

c) Les parties constante et variable des chaînes lourdes et légères sont sous la dépendance d'un contrôle génétique différent. Cependant, comme les parties variable et constante sont liées de façon covalente, synthétisées d'une seule pièce, et transcrites à partir d'un seul ARN messager, on doit envisager un processus somatique réalisant la fusion ou la translocation des gènes de la partie constante et de la partie variable (77). Le contrôle génétique de la partie C-terminale paraît être contrôlé par un seul gène. Pour expliquer le contrôle génétique de la partie variable, au moins deux hypothèses ont été proposées quant au nombre de gènes impliqués. L'hypothèse de la " lignée germinale multiple " postule que les gènes codant la partie variable sont présents dans la lignée germinale, et qu'ils ont été produits, lors de l'évolution, par le jeu des duplications géniques : on constate, en effet, comme nous l'avons vu, que les parties variables des μ et des λ peuvent être divisées en sous-groupes, sous-groupes qui représentent les branches principales de l'évolution. Dans la thorie de la mutation somatique, un nombre restreint de gènes code pour la partie variable. Ces gènes pourraient, après fécondation de l'oeuf, être modifiés et fournir des formes différentes, s'unissant plus tard avec le gène codant pour la région constante.

Enfin, à cause de l'homologie qu'on a pu noter entre chaînes lourdes et légères des espèces humaine et animale, il a été postulé que toutes les immunoglobulines sont dérivées phylogénétiquement d'un ancêtre commun ayant la longueur d'une demi-chaîne légère qui, par deux duplications successives, conduit aux différentes chaînes légères, puis aux chaînes lourdes (76).

2°) Les IgA sériques de PM 160 000 ont également la même structure de base que les IgG. La présence d'une cystéine terminale sur leurs chaînes lourdes conduit les IgA à s'associer entre elles pour former des polymères allant de 9S à 17S. Deux sous-classes existant

dans tous les sérums humains sont actuellement connues (43,83,162). 93% sont constituées par des IgA1 : les chaînes légères, dans cette sous-classe sont réunies aux chaînes lourdes par des liaisons covalentes ; chez les IgA2 (7% des IgA), les chaînes légères sont dimérisées et liées aux chaînes lourdes par des liaisons électrostatiques. On ne connaît pas encore exactement le nombre de ponts disulfure reliant les chaînes lourdes entre elles dans les deux sous-classes. Enfin, sous l'action de la papaïne, deux fragments Fab sont obtenus alors que le fragment Fc se trouve détruit. Un marqueur allotypique Am2, lié au système Gm, est spécifique des chaînes α_2 . Les IgA sont très riches en sucres (environ 10%).

- Les IgA sont présentes dans la plupart des liquides de sécrétion. Elles y sont rencontrées sous forme d'unités 7S dimérisées 11S, liées de façon covalente et non covalente par une glycoprotéine de PM = 58 000, appelée pièce sécrétoire, car produite par les cellules épithéliales des organes sécréteurs alors que l'IgA est synthétisée par les plasmocytes de la muqueuse.

3°) Les IgM sont des macromolécules de PM élevé = 900 000 et de coefficient de sédimentation 19S. Elles sont riches en sucres : environ 10%. Cinq sous-unités de PM = 180 000 s'associent pour former une molécule entière comprenant donc 10 chaînes lourdes et 10 chaînes légères. Chaque sous-unité est composée de chaînes lourdes μ et de chaînes légères dont 75% sont κ et 25% λ . Les sous-unités s'associent entre-elles pour former un pentamère en contractant des liaisons disulfure au niveau de la partie C-terminale de la chaîne lourde μ . Ces sous-unités peuvent être facilement séparées par réduction douce. Sous l'action de la papaïne et d'une faible quantité de réducteur, l'IgM libère deux fragments Fab μ , et un fragment Fc μ en forme d'anneau composé par les extrémités C-terminales des 10 chaînes lourdes tronquées encore réunies par les ponts disulfure inter-sous-unités et inter-chaînes μ . Le Fc est détruit sous l'action de la pepsine, alors que l'on obtient un fragment F(ab"2) μ . Au microscope électronique, l'IgM ressemble à une "araignée à cinq pattes", chaque patte rejoignant un anneau central (fragment Fc).

METABOLISME DES IMMUNOGLOBULINES

Dès 1922, GLENNY et HOPKINS (56,57) montraient que les anticorps injectés disparaissent du plasma du receveur par le jeu des effets combinés de la distribution et du catabolisme de ces molécules. Plus récemment, la compréhension des différents facteurs intervenant dans ce métabolisme a été facilitée par l'utilisation des marqueurs radioactifs.

- Les immunoglobulines, synthétisées par les plasmocytes, sont déversées dans le compartiment plasmatique et dans le compartiment extravasculaire. A l'état normal, les taux de synthèse et de catabolisme des immunoglobulines sont égaux. La concentration des différentes immunoglobulines est donc la résultante des effets cataboliques, ainsi que des taux de synthèse de ces protéines (174). Cependant, chaque classe d'immunoglobuline a des taux de synthèse et des localisations propres ; enfin, les voies cataboliques, ainsi que l'importance de ces dernières ne sont pas obligatoirement identiques pour chacune de ces classes.

En dehors des techniques qui consistent à mesurer le taux de disparition d'immunoglobulines injectées non marquées, on a étudié depuis une dizaine d'années, le devenir des protéines marquées, soit ^{125}I , soit ^{131}I . On définit plusieurs termes qui déterminent les paramètres métaboliques :

- Pool protéique plasmatique, P^+ =
volume de plasma X concentration protéique
sérique.
- Masse protéique extravasculaire, E =
activité totale corporelle - activité du pool
plasmatique.

- Fcr = Fraction du pool protéique intravasculaire catabolisée par unité de temps (par jour).
- T = Période ou demi-vie : temps au bout duquel la moitié des atomes injectés est désintégrée.
- Acr = Taux catabolique absolu : Fcr X pool protéique plasmatique.
- T et Fcr sont liés par l'expression suivante :

$$\text{Fcr} = \frac{\log 2}{T} \text{ dérive de l'équation exponentielle : } N = N_0 \cdot e^{-kT}.$$

METABOLISME DES IgG -

Les résultats obtenus chez l'homme indiquent que le taux d'IgG moyen par litre est de 12 g. Le pool d'IgG total circulant est de 0,50 g/kg, soit 35 g/70 kg, et la quantité d'IgG totale corporelle est de 1 g/kg, soit 70 g/ 70 kg. Le catabolisme quotidien, c'est-à-dire le Fcr, représente 6,3% du pool intravasculaire, soit 2,1 g/70 kg ; le taux de synthèse qui est de 32 mg/kg/jour, soit 2,2 g/70 kg/jour, est donc égal à la quantité catabolisée quotidiennement. La période ou demi-vie est de 21 jours. Cependant, l'étude du catabolisme des différentes classes d'IgG a montré que les IgG1, IgG2 et IgG4 ont un catabolisme identique à celui des IgG totales isolées de sérum normal par chromatographie, alors que les IgG3 ont une survie beaucoup plus courte : 7,5 à 9 jours au lieu de 21 jours : ce fait est à rapprocher du comportement des IgG myélomateuses soumises à l'action de la mercuripapaïne en présence de cystéine. Dans ces conditions, les γG_1 , γG_2 et γG_4 libèrent, en plus du fragment Fab pour toutes les classes et un fragment Fc pour les γG_1 , un fragment Fc (fragment Fc de mobilité rapide pour les γG_4), alors que les γG_3 produisent seules un fragment Fab : le fragment Fc doit donc être rapidement protéolysé dans cette sous-classe.

Les IgG ont la survie la plus longue et le Fcr le plus bas de toutes les protéines sériques.

METABOLISME DES IgM -

Les IgM ont un Fcr particulièrement élevé par rapport aux IgG : 18% du pool intravasculaire sont catabolisés par jour.

Les IgM totales corporelles s'élèvent à 49 mg/kg, soit 3,40 g pour un individu de 70 kg. La quantité d'IgM circulante est de 37 mg/kg, soit 2,590/70 kg. Le taux de synthèse est de 6,9 mg/Kg/jour ; la demi-vie est de 5,1 jours. Les IgM ont une distribution avant tout intravasculaire et un Fcr égal à 2 ou 3 fois celui des IgG.

METABOLISME DES IgA -

Etudiées sur 11 " paraprotéines " et sur 12 sérums normaux, la demi-vie des IgA est de 5 à 6,5 jours. 42% des IgA sont intravasculaires ; le taux de synthèse est de 24 mg/kg/jour. Ainsi, les IgG et IgA ont des taux de synthèse de même ordre de grandeur, les différences de concentration sérique des deux protéines, environ 6 fois plus d'IgG que d'IgA, sont dues au Fcr, 4 à 6 fois plus élevé chez les IgA.

METABOLISME DES IgD -

La concentration sérique des IgD est très basse : environ 25 mg/litre (133). 75% de ces immunoglobulines sont intravasculaires : valeur à peu près identique pour les IgM, mais plus élevée que pour les IgG et IgA = 45%. Le temps de demi-vie est de 2,8 jours. Le taux de synthèse est de 0,4 mg/kg/jour, soit environ 100 fois plus faible que celui des γ G, alors que le Fcr est 6 fois plus élevé que celui des γ G : 6% pour les γ G et 37% pour les γ D.

METABOLISME DES SOUS-UNITES D'IMMUNOGLOBULINES -

1°) Depuis la découverte de H. BENICE-JONES, en 1948 (5), d'une protéine à caractère thermosoluble dans l'urine de malades atteints de myélome multiple des os, un travail considérable a été réalisé sur ces protéines. Une étape très importante a été franchie lorsqu'il a été possible de relier d'une façon certaine la structure des protéines de "Bence-Jones" à celle des immunoglobulines. EDELMAN et GALLY (31), puis BERGGARD et EDELMAN (8) ont démontré d'une façon plus précise que les protéines de Bence-Jones correspondent aux chaînes légères des immunoglobulines, qui sont communes à toutes les classes de ces protéines. Cependant, un point très important restait à élucider, à savoir si les protéines de Bence-Jones étaient un produit de catabolisme de molécules plus importantes telles que les immunoglobulines, ou bien si elles représentaient des produits à existence autonome. D'abord considérées comme des

catabolites des protéines de myélome (140), plusieurs faits expérimentaux ont amené à considérer les protéines de Bence-Jones comme étant des produits synthétisés " de novo " à partir des acides aminés des cellules plasmocytaires : par l'étude du taux d'incorporation des acides aminés marqués dans les protéines de myélome et les protéines de Bence-Jones de malades ayant un myélome, PUTNAM (124), puis OSSERMANN (106) montrent que le pic d'activité spécifique est beaucoup plus tardif et plus bas dans la protéine myélomateuse que celui de la protéine de Bence-Jones. Or, d'après les critères de ZILVERSMIT (180), l'activité du précurseur doit être initialement plus élevée que celle du produit résultant : de ce fait, la "paraprotéine" ne peut être considérée comme le précurseur de la protéine de Bence-Jones. D'autre part, selon le deuxième critère du rapport existant entre précurseur et produit, le précurseur et le produit doivent avoir la même activité spécifique quand le produit a atteint son activité spécifique maximum : or, le pic d'activité spécifique de la protéine de Bence-Jones n'est pas identique à celui de la paraprotéine lorsque celle-ci a son activité spécifique maximum. Donc, pas plus que les protéines de Bence-Jones ne sont les produits des immunoglobulines, les protéines de Bence-Jones ne peuvent être les précurseurs des immunoglobulines. En injectant les protéines myélomateuses marquées ^{131}I à un malade ayant une protéinurie Bence-Jones, on n'obtient pas l'excrétion de Bence-Jones marquées. Ces résultats confirment les études au ^{14}C : les protéines myélomateuses ne sont pas le précurseur des Bence-Jones. Ce fait est valable également pour les chaînes légères d'immunoglobulines que l'on trouve dans les urines normales (158). Les travaux de GORDON (58) ont montré qu'il ne s'agit pas, là non plus, de protéines issues du catabolisme des immunoglobulines : elles appartiennent au pool de chaînes légères libres, intermédiaires de l'assemblage des chaînes polypeptidiques légères et lourdes en IgG (3). Les protéines de Bence-Jones et les chaînes légères d'individus normaux ont un métabolisme tout à fait différent de celui des immunoglobulines entières. La demi-vie des chaînes légères, étudiée sur des chaînes légères isolées, est de 0,8 à 1,6 heure et le Fcr est environ 100 fois celui des molécules d'IgG intactes (177). Le rein est un site important du catabolisme des Bence-Jones, mais pas des immunoglobulines intactes ; c'est ainsi que la survie des protéines de Bence-Jones est très prolongée chez les individus qui ont une maladie rénale, alors qu'il n'y a pas de répercussion sur la survie des IgG. On peut donc dire que le métabolisme des IgG n'est pas

sous la dépendance de la chaîne légère. Des études réalisées chez l'homme (55) sur les fragments Fab et F(ab')₂ ont également montré que ces derniers ont une survie très courte, de 3,6 à 5 heures.

En 1966, SOLOMON (149) détecte dans l'urine de sujets myélomateux, des protéines de faible poids moléculaire en relation avec les protéines de Bence-Jones, mais qui manquent de certains déterminants antigéniques : ces protéines d'ailleurs ne peuvent être mises en évidence qu'au moyen d'immunsérums anti-Bence-Jones homologues : ces protéines sont en relation étroite avec l'extrémité N-terminale des protéines de Bence-Jones (149,165). Ces fragments de chaînes légères apparaissent chez environ le tiers des Bence-Jones étudiées : Kappa et Lambda ; les études de séquence indiquent que la longueur de ces fragments correspond à celle de la moitié variable (21). L'origine de ces fragments est catabolique. D. CIOLI (21) montre que l'apparition de ces derniers est subordonnée à la structure des protéines de Bence-Jones : certaines de ces protéines sont susceptibles d'être dégradées et non toutes. Il est possible que la digestion exopeptidasique soit arrêtée dans une région où la configuration tri-dimensionnelle de la protéine empêche l'attaque. L'injection à un malade qui excrète, en plus d'une Bence-Jones, ces fragments, d'une Bence-Jones hétérologue excrétée sans accompagnement de fragment, ne conduit pas à la formation de fragments : la propriété d'être dégradée en fragment est donc caractéristique de quelques Bence-Jones "fragiles" et n'est pas déterminée par le malade. Des résultats opposés ont été obtenus, non avec des protéines de Bence-Jones, mais avec des IgG chez des sujets atteints de maladies du collagène : chez ceux-ci, il se produit un hypercatabolisme, que ce soit en utilisant l'IgG du malade ou celle d'un autre sujet : il s'agirait donc, dans ce cas, d'un effet dû à l'hôte et non à l'IgG proprement dite (178).

2°) Un fragment apparenté à la chaîne lourde γ a été trouvé dans le sérum et l'urine de certains sujets atteints d'une maladie proche du myélome (51,34,85,167) : la maladie dite des "chaînes lourdes". FRANKLIN (51), par marquage avec ¹³¹I, a pu montrer que cette chaîne lourde avait une synthèse indépendante et donc qu'elle n'était pas le reflet d'un catabolisme particulier d'IgG.

EIN, plus précisément, sur une chaîne lourde appartenant à la classe des γG_3 (33) et marquée également ^{131}I , a pu constater que celle-ci avait le même comportement catabolique que les γG_3 : la période est identique à celle des γG_3 intactes ; en revanche, le taux de synthèse est très élevé, 0,42 g/kg/jour, comparé au taux de synthèse des IgG de l'individu normal : 0,034 g/kg/jour. L'accumulation de ce fragment ne provient donc pas d'un défaut du catabolisme, mais d'une synthèse excessive.

Contrairement au fragment Fc retrouvé dans les cas de maladie des chaînes lourdes, l'origine du fragment Fc ou F'c mis en évidence dans les urines normales (7,168,86) est catabolique. VAUGHAN (173), par administration de ^{14}C à un malade atteint d'arthrite rhumatoïde, trouve une activité dans les chaînes légères de l'urine normale, mais non dans le fragment Fc, alors que l'administration au même malade d'IgG marquée ^{131}I conduit à l'excrétion d'un fragment Fc marqué.

Le métabolisme du fragment Fc est ainsi très différent de celui des chaînes légères ou du Fab, et voisin de celui des IgG : la période du Fc est égale à plus de 30 fois celle des chaînes légères ou du Fab, et environ à la moitié de celle des IgG (33). Il existe donc un rapport très étroit entre le métabolisme du Fc et celui des IgG, et les différences observées dans le catabolisme des différentes classes d'IgG sont en rapport avec les différences structurales de cette partie : le Fc, spécifique de chaque classe d'IgG.

SITES DU CATABOLISME -

Alors que l'on connaît maintenant dans leurs grandes lignes les comportements métaboliques des immunoglobulines, de leurs chaînes et de leurs fragments, on ne sait que peu de chose sur les sites exacts de catabolisme de ces protéines ; de plus, les résultats obtenus sont bien souvent contradictoires : c'est ainsi que ANDERSEN (1), chez l'animal, estime à 38% le catabolisme des IgG dans l'intestin grêle, alors que GITLIN ne constate pas de variation de catabolisme chez les rats, souris ou lapins après extirpation du tractus gastro-intestinal sub-diaphragmatique. Le rôle du rein dans le catabolisme des immunoglobulines a été plus

particulièrement étudié par WOCHNER (177) : l'étude portant sur les immunoglobulines entières, les chaînes légères séparées, les fragments Fc et Fab, chez des souris soit intactes, soit néphrectomisées, ou bien encore après ligature des uretères. Les résultats indiquent que la durée de vie des molécules d'IgG, du fragment Fc et à un degré moindre du Fab, est identique dans les trois lots de souris. Les résultats sont identiques pour les IgA et IgM.

A l'inverse, le catabolisme des chaînes légères apparaît entièrement différent. Comme nous l'avons vu, la survie des Bence-Jones est très courte : en outre, seulement 10% environ sont excrétés par le rein, le reste étant catabolisé par l'organisme (150). Dans l'étude de WOCHNER, la survie des Bence-Jones est très augmentée chez l'animal néphrectomisé, d'autre part, lorsqu'on laisse la souris, dont les uretères ont été liés, développer un syndrome urémique, la survie des Bence-Jones est très prolongée : ces résultats indiquent clairement le rôle du rein dans le catabolisme des Bence-Jones.

Les résultats, chez l'homme, sont parallèles à ceux obtenus chez l'animal : le catabolisme des protéines de Bence-Jones est très réduit chez l'insuffisant rénal, contrairement à celui du sujet normal et celui atteint d'affection hépatique : demi-vie de 4 heures, alors qu'elle atteint 8 à 32 heures chez le sujet insuffisant rénal. (97). Les études faites par immunofluorescence sur le rein du sujet myélomateux montrent une fluorescence très marquée non au niveau des glomérules, mais à celui des tubules (89). Les chaînes légères passent donc facilement à travers la membrane basale glomérulaire, et sont réabsorbées au niveau tubulaire pour être catabolisées. Il ne semble pas toutefois que le contact des chaînes légères avec les cellules tubulaires soit le seul responsable de la survie de ces protéines, puisqu'après ligature des uretères qui stoppent brutalement la filtration glomérulaire, le catabolisme des Bence-Jones reste inchangé. L'ensemble des résultats est cependant en faveur d'un rôle prépondérant du rein dans le catabolisme des Bence-Jones.

Le rôle et l'importance des autres organes dans le catabolisme des immunoglobulines n'a pu être établi encore de façon très claire. Par perfusion hépatique in vitro de gamma-globulines chez

le rat (22), COHEN trouve que le taux d'IgG catabolisées est supérieur à celui de l'albumine, et correspond à 30% du catabolisme total des IgG : cependant, il ne semble pas que le foie perfusé in vitro se comporte comme le foie normal.

Il n'a pu être démontré de catabolisme particulier dans les organes autres que le foie, rein, et tractus gastro-intestinal, de même que l'on ignore encore le rôle exact du système réticulo-endothélial.

Le catabolisme des immunoglobulines est influencé par différents facteurs qui ont également un retentissement sur le comportement des autres protéines sériques : c'est ainsi que, chez l'homme, le Fcr est augmenté dans les syndrômes infectieux associés à de la fièvre ; chez les rats et les lapins qui reçoivent des injections de thyroxine, la survie des IgG est très diminuée (29,41).

Le catabolisme des immunoglobulines est également sous la dépendance de la concentration sérique des immunoglobulines, mais est différent selon les classes d'Ig. Pour la classe la plus importante: les IgG, le Fcr varie proportionnellement à la concentration plasmatique : ainsi, chez les sujets atteints de myélome, de cirrhose, ou de maladies rhumatoïdes et qui ont une concentration élevée d'IgG, la demi-vie peut atteindre 11 jours (104). Réciproquement, dans les hypogammaglobulinémies liées au sexe ou celles accompagnant le tymome ou la leucémie lymphoïde, la survie des IgG est très prolongée, dépassant parfois 30 jours.

Il faut remarquer que ce rapport concentration-métabolisme est relié de façon très spécifique au taux d'IgG ; ainsi, la concentration des autres immunoglobulines n'a aucun effet sur le catabolisme des IgG, de même que la concentration des autres protéines plasmatiques, les études ayant été réalisées chez des sujets atteints de maladie de Waldenström, ayant donc un taux sérique élevé d'IgM, et des myélomateux dont le sérum contenait en quantité importante une paraprotéine IgA ou une protéine de Bence-Jones.

Chez le lapin et la souris, les résultats sont identiques à ceux obtenus chez l'homme, mais chez le cobaye, la demi-vie

des IgG reste identique, quelle que soit la concentration. FAHEY (38) a pu montrer que la partie de la molécule responsable de cet effet concentration-catabolisme était localisée au niveau du fragment Fc car, seule l'injection de Fc, et non celle du Fab, accélère le catabolisme de l'IgG.

L'hypothèse de BRAMBELL (15) est qu'une fraction constante d'IgG est isolée de la circulation puis détruite, par exemple à l'intérieur de vacuoles de pinocytose, alors que l'autre partie se trouve protégée ; ceci pourrait se faire au moyen d'une protéine qui serait capable d'être saturée par l'immunoglobuline. Ainsi, à forte concentration d'IgG, seulement une petite partie d'IgG pourrait être protégée, ce qui expliquerait la durée de vie écourtée de l'immunoglobuline.

Inversement, une faible concentration d'IgG favoriserait la durée de vie de cette protéine.

Pour les IgA et IgM, la fraction catabolisée est indépendante de la concentration sérique, donc la masse de protéine détruite est directement proportionnelle à la concentration. STROBER (157) a montré que le Fcr était identique chez les sujets normaux aussi bien que chez les malades atteints de myélome IgA d'hypogammaglobulinémie ou de déficience sélective en IgA. Ce fait a également été remarqué dans le métabolisme du fibrinogène et de la céruloplasmine.

Enfin, ROGENTINE (133), étudiant le comportement des IgD chez différents sujets, a montré qu'il existait un rapport inverse entre Fcr et concentration : le catabolisme de l'IgD est d'autant plus bas que sa concentration sérique est élevée.

o

o

o

T E C H N I Q U E S

A- TECHNIQUES ANALYTIQUES.

- IMMUNO-ELECTROPHORESE -

PRINCIPE :

L'immuno-électrophorèse est une technique en deux temps qui consiste, dans un premier temps, à pratiquer une électrophorèse dans un gel d'agar ou d'agarose, puis dans un second temps, à réaliser une diffusion à l'intérieur même du gel, d'un immunsérum qui peut être soit polyspécifique, c'est-à-dire capable de réagir contre un grand nombre de protéines, soit monospécifique ; dans ce cas, l'immunsérum ne possède qu'un seul type d'anticorps dirigé contre une protéine uniquement.

A l'équilibre antigène-anticorps, un précipité se constitue sous la forme généralement d'un arc qui traduit la présence d'une protéine.

Nous avons utilisé la micro-technique de Scheidegger, en agar (141).

REACTIFS :

a) Tampon véronal : pH : 8,4.

véronal : 7,36g. 0,01 M.

véronal sodique : 41,6 g. 0,05 M.

eau distillée Q.S.P. 4 litres.

Le véronal est dissous à chaud, puis on ajoute le véronal sodique. Cette solution est utilisée pour la préparation de la suspension d'agar et également pour le remplissage des bacs.

b) Suspension d'agar noble difco : 1,3%

Elle est réalisée dans la solution tampon. On porte à ébullition jusqu'à charification de la suspension.

c) Suspension d'agar noble difco : 3%

Elle est réalisée dans la solution tampon et sert à la "fixation" des lames porte-objets pour éviter le décollement de l'agar de la plaque de verre.

d) Colorant : Rouge Ponceau S extra.

Acide acétique concentré	: 30 ml.
Acétate de sodium	: 6,80 g.
Eau distillée	: 970 ml.
100 ml de cette solution sont remplacés par	
100 ml de glycérine.	

Après dissolution, on fait une solution à 1°/oo de rouge Ponceau S extra par simple dissolution à froid.

e) Matériel :

Générateur type L.K.B. 3290 B. Emporte-pièce type L.K.B.
Chassis plastique de six lames. Lames porte-objets 75mm x 25mm.
Pipettes capillaires. Mèches de tissu poreux 50mm x 130mm pour raccorder les chassis au liquide tampon des bacs. Table à niveau.
Aiguille de ~~Ø~~ interne 1mm reliée à une trompe à eau.

MODE OPERATOIRE :

Après "fixation" des lames porte-objets au moyen d'une goutte de suspension d'agar chaud à 3%, un chassis de lames est recouvert d'agar chaud à 1,3%. Après prise en masse à l'air libre, les gouttières et godet de départ sont tracés au moyen de l'emporte-pièce. Au moyen de l'aiguille reliée à la trompe à vide, on aspire avec précaution le petit cylindre d'agar, puis la solution protéique à analyser est placée dans le godet de départ au moyen

d'un capillaire : un remplissage convenable est constaté par l'apparition d'un ménisque convexe à la surface du gel. La migration électrique est réalisée pendant 90 minutes avec une d.d.p. aux lames de 300 volts.

La d.d.p. réelle dans le gel est de 4,5 V/cm. La migration réalisée, on verse l'immunsérum dans la gouttière centrale et on laisse diffuser pendant 16 heures minimum. Après ce temps, la lecture des plaques peut être faite au moyen d'un négatoscope muni d'un fond noir. Les lames sont immergées ensuite dans un bain d'eau physiologique pendant 24 heures minimum. Les lames recouvertes d'un papier filtre humidifié sont séchées à 37°, pendant 12 heures, puis colorées pendant 15 minutes. Les lames sont séchées dans une étuve à 120°. Les lames ont été photographiées soit après diffusion, soit après séchage et coloration, au moyen d'un appareil photographique POLAROID Cu5.

-DOUBLE DIFFUSION EN DEUX DIMENSIONS : METHODE D'OUCHTERLONY (108) -

Cette technique consiste à recouvrir une plaque de verre d'un gel d'agar, ou d'agarose dont la concentration est généralement de 1,3% soit en tampon véronal, soit dans l'eau physiologique. Au moyen d'un emporte-pièce, une série de trous est percée dans le gel, à égale distance du trou central : les trous sont soit de diamètre égal, soit de diamètre différent : l'intérêt, dans ce dernier cas, est de pouvoir utiliser des quantités d'antigène plus importantes lorsque la réaction antigène-anticorps est faible. Les plaques peuvent être séchées et colorées de la même façon que les lames d'immuno-électrophorèse. L'intérêt majeur de cette technique est de pouvoir comparer un mélange de protéines lorsqu'on possède un immunsérum contenant tous les anticorps dirigés contre les protéines présentes.

-ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAR -

Cette technique utilise les mêmes tampon et gel que l'immuno-électrophorèse et le protocole opératoire est identique au premier temps de l'immuno-électrophorèse : pour réaliser l'inclusion,

une bande de papier de 3,5mm de largeur et de 0,1mm d'épaisseur est enfoncée dans le gel ; le liquide à analyser est introduit dans la fente pratiquée. Après l'électrophorèse, les protéines sont fixées en immergeant la lame dans une solution contenant :

alcool 90°	:	70 ml.
acide acétique pur	:	5 ml.
eau distillée	:	25 ml.

La résolution des protéines d'un sérum humain total produit une zone albumine, une zone α_1 , une zone α_2 , une ou deux zones β : la deuxième zone β_2 quand elle est présente, correspond à l'arc β_1C de la fraction C'3 du complément.

Cette technique a l'avantage de permettre un repérage rapide de fractions protéiques, puisque dès la fixation des protéines celles-ci sont visibles à l'intérieur du gel, sous forme d'une zone blanchâtre.

ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON -

Les protéines, dans ce support, migrent selon leur charge électrique, mais la structure du gel, qui se comporte comme un filtre, ralentit la migration des molécules les plus volumineuses : ce freinage est d'autant plus important que la taille des protéines est grande.

Nous avons adopté la technique en tampons discontinus de POULIK dans l'électrophorèse horizontale.

1°) Tampon des bacs électrodes :

Acide borique 0,3 M	18,6 g.
Soude 0,06 M	2,4 g.
Eau distillée Q.S.P.	1000 ml.
pH : 8,2.	

2°) Tampon de préparation du gel d'amidon :

Solution mère :

Tris hydroxyméthyl aminométhane	18,4 g.
Acide citrique	21 g.
Eau distillée Q.S.P.	200 ml.

Ce tampon est dilué au 1/10 au moment de l'emploi :
Solution mère : 1 volume
Eau distillée : 9 volumes
pH : 8,65 à 9.

Nous n'avons pas adopté de modifications majeures à cette technique qui est décrite en détail par ailleurs (45).

Cette méthode a l'avantage sur l'électrophorèse sur papier ou acétate de cellulose de résoudre en plusieurs bandes une région protéique qui apparaît diffuse sur ces milieux. Dans le cas particulier des protéines urinaires, on peut obtenir ainsi une séparation nette de la zone pré-albumine-albumine-post-albumine qui reste diffuse en électrophorèse sur papier.

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLY-ACRYLAMIDE (Technique en disque) -

Le gel d'acrylamide est un support qui possède des propriétés l'apparentant au gel d'amidon. Nous avons modifié dans certains détails techniques la méthode publiée par L. ORNSTEIN et B.J. DAVIS.

TECHNIQUE :

Les solutions-stock utilisées et l'acrylamide sont identiques à ceux employés dans la technique originale (105), La fabrication et la mise en place de l'échantillon à l'intérieur du cylindre ont été légèrement modifiées.

Les tubes utilisés sont des tubes cylindriques "SHANDON" de 7,5 cm de longueur et de 5 mm de diamètre.

1°) Le tube est obturé par un bouchon plastique, puis on introduit 0,15 à 0,20 ml d'une solution de saccharose à 40% de façon à dépasser légèrement le niveau du bouchon inférieur.

2°) On coule alors, au dessus du saccharose, au moyen d'une pipette Pasteur et sur une hauteur de 4 à 5 mm, la solution "large pore" et pour obtenir une surface plane on verse quelques gouttes d'eau distillée sur la surface du gel.

3°) On réalise alors la photo-polymérisation sous U-V du gel : celle-ci est terminée lorsqu'un témoin identique placé dans un tube à essai s'est pris en masse ; le temps nécessaire est de 30 minutes environ. On élimine alors l'eau en égouttant soigneusement le tube sur un linge.

4°) Le gel "small pore" est versé alors dans le tube cylindrique jusqu'à 1 à 2 mm du haut du tube, et de la même façon que précédemment, on verse quelques gouttes d'eau distillée au haut de ce tube.

5°) La polymérisation de ce gel s'effectue ensuite à l'obscurité. On réalise, comme précédemment, un témoin de prise en masse : le temps nécessaire est de 45 minutes au minimum. Quand la polymérisation est terminée, on élimine l'eau du tube.

6°) Le tube est alors retourné et le bouchon ôté très soigneusement. La petite quantité de saccharose est éliminée et l'échantillon qui doit contenir environ 200 μg de produit, est introduit à la surface du gel au moyen d'une micro-seringue ; on complète ensuite avec la solution de saccharose à 40%. Dans le bas du tube se trouve alors le gel "small pore" et l'extrémité de ce tube est remplie alors de quelques gouttes de tampon.

7°) Le tube est alors prêt pour l'électrophorèse et placé dans l'enceinte. Dans le bac supérieur, on verse quelques gouttes d'une solution à 1°/100 de bleu bromophénol qui permet de suivre la migration, l'anode étant en bas, la cathode en haut. 5 mA sont utilisés par tube. L'électrophorèse est terminée lorsque la zone de bromophénol parvient à environ 5 mm de l'extrémité du tube.

8°) Pour la coloration du gel lui-même, le tube est immergé dans une cuvette d'eau distillée, le gel est détaché du tube à l'aide d'une fine corde à piano, puis expulsé en s'aidant d'une ventouse. Le gel est alors placé dans un tube à hémolyse, "small pore" en haut, puis coloré à l'amidoschwartz ou au bleu de Coomassie.

9°) La décoloration peut s'effectuer par électrophorèse après avoir placé le gel "large pore" au bas, dans un tube à extrémité

rétrécie après chauffage du bec bunsen. L'électrophorèse est alors mise en route, la polarité des électrodes étant inversée, l'intensité est de 15 mA par tube. Cette décoloration dure de 40 à 50 minutes avec le bleu de Coomassie. Elle est plus longue avec l'amidoschwartz. On peut également décolorer le gel dans l'acide acétique à 7% pendant une nuit.

-IMMUNO-DIFFUSION RADIAIRE SIMPLE EN DEUX DIMENSIONS -

Cette technique, mise au point par MANCINI (92), consiste à incorporer dans un gel d'agar ou d'agarose un immunsérum monospécifique, puis à percer à l'intérieur de ce gel une série de réservoirs destinés à contenir l'antigène : ce dernier diffuse alors dans le gel et le complexe antigène-anticorps formé au bout d'un temps variable, se traduit par un cercle dont on déterminera la surface. Cette dernière obéit à deux lois : d'une part, la surface obtenue est proportionnelle à la concentration de l'antigène, et elle est, d'autre part, inversement proportionnelle à la concentration en anticorps. De plus, la grandeur du précipité est inversement proportionnelle à la taille moléculaire de la protéine étudiée.

Les effets relatifs à la seconde loi de MANCINI, et à la différence de rapport des surfaces obtenues pour deux protéines de taille moléculaire différente, ont été utilisés comme nous le verrons ultérieurement, dans la détermination des concentrations des chaînes légères d'immunoglobulines urinaires.

TECHNIQUE :

La technique utilisée est identique dans la préparation de l'agar et des plaques à celle décrite dans la technique originale. Nous la décrivons cependant de façon détaillée, car quelques modifications ont été apportées à cette méthode.

1°) Préparation de l'agar :

Tampon véronal :	Véronal sodique	9 g.
	ClH N/10	65 ml.
	Hydrazide sodium	0,5 g.
	Eau distillée Q.S.	pour 1000ml.
	pH : 8,6	force ionique 0,1.

Ajouter 2,5 g. spécial Agar Noble Difco. Placer dans un bain marie bouillant jusqu'à dissolution. On évite une évaporation intempestive en plaçant sur la fiole d'Erlenmeyer un tube de verre de 50 cm de longueur qui sert de réfrigérant.

2°) Préparation du mélange agar-antisérum :

La quantité requise du mélange ci-dessus est placée dans un bain marie à +56°C: en aucun cas, en effet, la suspension d'agar ne doit dépasser une température de +60°C. Dans la méthode pratiquée, nous utilisons 0,6 ml d'antisérum dilué dans des proportions variables : (nous mentionnerons ultérieurement les dilutions requises pour le dosage des γ G et des chaînes légères urinaires), puis 0,6 ml de tampon véronal, enfin 6 ml de suspension d'agar à 2,5%. De ce fait, la dilution de l'immunsérum dans la plaque est de : 1/12. Le mélange de ces constituants est réalisé dans une fiole d'Erlenmeyer à 56°C puis coulé aussitôt à l'intérieur d'un moule comme décrit ci-dessous.

3°) Préparation des plaques :

A- Afin d'obtenir une couche d'épaisseur uniforme de gel, nous utilisons un moule réalisé de la façon suivante : un cadre en forme de U, de 1 mm d'épaisseur et de côtés : 70 mm x 80 mm. est glissé entre deux plaques de verre : 100 mm x 70 mm de côté; le système étant maintenu rigide à l'aide de pinces. L'une des deux plaques est au préalable siliconée au moyen de la solution hydrofugeante suivante :

Rhodorsil hydrofugeant :	8 g.
Alcool butylique normal :	92 g.
Calsolène en solution à 50% dans butanol :	0,4 g.

La seconde plaque qui servira de support à la couche d'agar est préalablement fixée avec une mince couche d'agar à 3%.

B- La suspension gel-anticorps maintenue à +56°C est alors coulée au moyen d'une pipette dans le moule ainsi réalisé et maintenu verticalement. Après 10 minutes de refroidissement à la température du laboratoire, les pinces sont ôtées et l'on fait glisser alors la plaque siliconée sur le gel. Il est possible,

alors, de percer à la surface du gel une série de trous à l'aide d'un emporte-pièce de 3 mm de diamètre intérieur : le cylindre de gel compris est éliminé au moyen d'une aiguille branchée sur une trompe à vide. La solution protéique à analyser est introduite dans les trous pratiqués à l'aide d'une micro-seringue type Hamilton sous un volume de 7,8 μ I.

4°) Développement du précipité antigène-anticorps :

Les plaques préparées sont ensuite placées à l'intérieur de boîtes de pétri dont le fond est recouvert d'une couche de cellulose humidifiée pour éviter le dessèchement des plaques. Celles-ci sont maintenues pendant 4 jours à la température du laboratoire. Après ce temps, les plaques sont lavées pendant 24 heures, dans du sérum physiologique : le sérum physiologique persistant dans le trou est éliminé au moyen d'un fin tortillon de papier-filtre qui absorbe le liquide par capillarité. Les trous sont ensuite bouchés en introduisant une goutte d'agar.

5°) Coloration :

Les plaques sont colorées au moyen du bleu de Coomassie : ce colorant, du groupe des triphénylméthanes a, sur d'autres colorants, comme le noir Amido par exemple, l'avantage d'un pouvoir de coloration trois à cinq fois supérieur, d'où une plus grande sensibilité pour la mise en évidence d'échantillons de faible concentration en protéines.

Les plaques sont immergées pendant une heure dans ce colorant.

a) Solution mère :

Méthanol	:	500 ml
Acide acétique pur:		100 ml
Bleu de Coomassie :		2,5 g
Eau distillée Q.S.P.		1000 ml

b) Solution à utiliser :

Solution mère	:	50 ml
Méthanol	:	400 ml
Acide acétique pur:		50 ml
Glycérine	:	25 ml
Eau distillée Q.S.P.		1000 ml.

6°) Décoloration :

Ce dernier temps est très important, car il conditionne la lecture du diamètre du cercle obtenu. Nous avons trouvé que la décoloration la plus efficace consiste à immerger simplement la plaque dans un petit bac d'eau distillée contenant un sachet de Dowex 1 : résine échangeuse d'ions à forte affinité pour le colorant. Le bac est mis à agiter pendant 4 à 5 heures dans un agitateur longitudinal.

7°) Lecture des diamètres :

Le diamètre des cercles obtenus est mesuré à l'aide d'une loupe micrométrique, puis la surface calculée. Nous verrons ultérieurement, d'une façon détaillée, l'établissement des courbes permettant d'obtenir la concentration en protéine des liquides examinés.

I- DOSAGE DES PROTEINES -

I/ Protéines purifiées par passage sur résines échangeuses d'ions, gel-filtration ou électrophorèse préparative :

a) Les échantillons à analyser et doser sont utilisés tels quels ou après concentration. La teneur en protéine peut être déterminée en utilisant le coefficient d'extinction propre à chacune de ces protéines : pour les IgG : $E^{1\%}_{1\text{cm}} = 13,8$ à 280nm, si l'on s'est assuré au préalable au moyen d'un ou plusieurs immunsérums de la pureté de l'échantillon ou en se servant d'une courbe d'étalonnage à 280 nm.

b) Après lyophilisation des IgG, chaîne légère ou toute autre fraction d'immunoglobuline, le poids exact de l'immunoglobuline contenue dans l'échantillon est rectifié par dosage d'azote selon la méthode de KJELDAHL. L'appareil utilisé est celui de PARNAS et WAGNER, type F. Martin, fabriqué par PROLABO. Nous ne décrivons pas en détail cette technique, basée sur le principe suivant : après minéralisation de la substance protéique, l'ammoniaque est déplacé par la soude, puis titré dans une solution d'acide borique-alcool, par ClH 0,02 N en présence de vert de Bromocrésol. La quantité d'azote pour cent de protéine est donnée par :

$$N \% = \frac{100}{P} \quad 14,008 (n - n') f.$$

où f est le titre de ClH, n le volume de ClH utilisé, P la prise d'essai et 14,008 l'équivalent d'azote.

Nous verrons ultérieurement l'utilité du dosage d'azote dans la rectification des quantités lyophilisées pesées d'immunoglobulines pour la préparation des gammes-étalon, lors du dosage immunologique des Ig. par la technique de MANCINI.

II/ Dosage des protéines dans l'urine :

Deux techniques sont utilisées, selon l'importance de la protéinurie :

a) Lorsque la protéinurie est égale ou inférieure à 2‰, nous utilisons une technique néphélométrique, au moyen de l'acide trichloracétique selon la technique de HENRY, SOBEL et SEGALOVE (72) ;

b) Lorsque la protéinurie est supérieure à 2‰, nous utilisons une technique colorimétrique au biuret, selon P. FLEURY et R. EBERHARD (46).

- CONCENTRATION DE L'URINE ET DES SOLUTIONS PROTEIQUES -

1°) URINE :

Après dosage de la protéinurie, la concentration protéique est amenée à une concentration voisine de 30‰. Deux techniques

peuvent être utilisées :

- a) l'urine est concentrée dans un boyau de dialyse "VISKING" (ϕ des pores = 24 R.) contre du poly-éthylène glycol : Carbowax 20 M.
- b) L'urine est concentrée dans une cellule Millipore U-FHI Flux munie d'une membrane Pellicon : cette membrane de type PSAC a la particularité de s'opposer au passage des substances dont la taille moléculaire est égale ou supérieure à 1000. Une pression positive de l'ordre de 14 kg/cm^2 est appliquée au moyen d'un courant d'azote sur la surface de la membrane. Cette dernière méthode a l'avantage de réduire le temps de concentration. Après concentration, l'échantillon est remis au volume désiré au moyen d'eau physiologique ou du tampon employé pour l'électrophorèse.

2°) SOLUTION DE PROTEINES :

Elles peuvent être concentrées de la même façon que ci-dessus.

L'utilisation de l'une ou l'autre de ces techniques ne conduit à aucune dénaturation des protéines, contrairement à la technique de concentration par pervaporation.

B- TECHNIQUES PREPARATIVES DES PROTEINES.

PRECIPITATION PAR LES SELS NEUTRES :

Elle consiste à précipiter les protéines par le sulfate d'ammonium à 50% de saturation et à pH acide = 4,5. Dans ces conditions l'albumine et les globulines sont précipitées. Nous verrons en détail au chapitre suivant l'application de cette technique à la séparation des protéines urinaires.

CHROMATOGRAPHIE SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS :

Deux types de résines peuvent être utilisées pour la séparation des protéines sériques ou urinaires : il s'agit soit d'échangeurs anioniques dont le type est la DEAE-cellulose, soit d'échangeurs cationiques comme les résines carboxyméthylées ou sulfoéthylées.

De très nombreux auteurs ont utilisé avec succès l'échangeur DEAE : nous avons employé également cette résine.

1°) UTILISATION DE LA DEAE-CELLULOSE :

- a) Préparation de la résine : DEAE-cellulose (EASTMAN Organic Chemicals : 0,75 meq./g.)

La préparation de la résine avant utilisation consiste en lavages successifs à l'eau distillée, puis à la soude N/10 et ClH N/10. Pour 100 g. de cellulose, le volume des solutions de lavage est de quatre litres.

- 1) Un premier lavage est réalisé à l'eau distillée pendant 15 minutes, décantation et filtration sur fiole de Büchner ;
- 2) Puis, un lavage dans les mêmes conditions que ci-dessus, au moyen de la soude N/10 ;
- 3) Lavage à l'eau jusqu'à pH : 8 ;
- 4) Lavage avec ClH N/10 ;
- 5) Lavages successifs à l'eau jusqu'à pH : 5 ;
- 6) Lavage avec NaOH N/10 ;
- 7) Lavages successifs à l'eau jusqu'à pH : 8 ;
- 8) deuxième lavage avec NaOH N/10 ;
- 9) lavages successifs à l'eau jusqu'à pH : 8.

b) L'équilibrage de la résine consiste à mettre cette dernière dans trois litres d'un tampon adéquat sous agitation, avec décantation et filtration successives sur fiole de Büchner jusqu'à obtenir le pH du tampon.

c) Remplissage de la colonne :

La résine est ensuite introduite dans une colonne en verre de 50 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre, munie d'un robinet et d'un verre fritté à sa base.

Le remplissage de la colonne au moyen de cette résine est une opération simple, sans précautions particulières : la compacité de la résine n'entraîne pas de colmatage du verre fritté ; le débit peut être réglé au moyen d'un robinet.

d) Chargement de la colonne, et récupération des fractions :

L'introduction de l'échantillon de protéines à l'intérieur de la colonne se fait à raison de 10 mg pour 1,5 ml de DEAE-cellulose. L'écoulement du liquide, hors de la colonne, se fait sans l'aide d'une pompe. Les fractions sont recueillies dans un collecteur de fractions

fonctionnant par siphonnage. Les volumes recueillis par tube sont en général de 10 ml. La lecture des tubes est réalisée soit au moyen d'un enregistreur automatique de type LKB, soit manuellement au spectrophotomètre à 280 nm.

e) Régénération de la cellulose :

Après chromatographie, la résine est sortie de la colonne. Pour éliminer les protéines susceptibles d'être restées fixées sur la cellulose, la DEAE est agitée dans un tampon de molarité élevée et de pH bas, par exemple un tampon phosphate pH 4,5 - 1 M. On filtre, essore, et lave dans de grandes quantités d'eau distillée pour éliminer les sels en excès : on remet en suspension dans le tampon d'équilibrage, et on lave plusieurs fois jusqu'à obtention du pH désiré.

Après un certain temps d'utilisation, la DEAE sera régénérée plus énergiquement par lavage à la soude 1 N, puis ClH 1 N, enfin à l'eau et au tampon.

2°) UTILISATION DE RESINE CATIONIQUE TYPE SULFO-ETHYLE-SEPHADEX :
S.E. SEPHADEX :

Le S.E. SEPHADEX est un échangeur fortement acide. Il est utilisable sous sa forme sodium, c'est-à-dire avec des contre-ions sodium. Il est fortement hydrophile et gonfle dans l'eau et les solutions salines. Nous avons employé le type A(50) dont le degré de réticulation est moins important que le type (25).

La préparation de ce gel est plus simple que celle de la résine précédente, car il peut être utilisé sous sa forme sodium.

a) Préparation du gel :

L'échangeur est mis à gonfler dans une quantité très généreuse du tampon éluant initial. Au cours d'une période de 24 heures, le liquide qui fait surface est remplacé 2 à 3 fois par une solution tampon fraîche. Le gel peut être employé sans autre traitement. En revanche, le remplissage de la colonne est plus délicat

qu'avec la DEAE-cellulose, en particulier à cause des risques de colmatage qui rendent impossible l'utilisation des colonnes à base en verre fritté. Il est nécessaire, pour ce type de gel, d'employer une membrane à mailles très fines.

b) Remplissage :

La colonne, dont la base est fermée, est munie à son extrémité supérieure d'un entonnoir ajusté hermétiquement à la colonne par un point en caoutchouc. On verse alors par l'entonnoir avec précaution le gel contenu dans le tampon : de cette façon, non seulement la colonne mais l'entonnoir également sont emplis de tampon et de gel, ce qui évite les adjonctions qui provoquent des couches successives à l'intérieur de la colonne. Quand 5 à 6 cms de gel se sont déposés, on ouvre le bas de la colonne et on laisse couler librement, de façon lente, jusqu'à l'obtention de la hauteur de gel désirée.

c) Chargement et récupération des fractions :

Ces opérations sont identiques à celles vues précédemment pour la DEAE-cellulose.

- GEL-FILTRATION -

Cette technique est utilisée dans les cas où il est nécessaire d'effectuer la séparation de protéines de PM différent. Le principe est basé sur le fait que les molécules diffusent plus ou moins dans le gel suivant leur taille et leur forme : les molécules quittent le gel dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes. Le choix du Sephadex à utiliser repose sur l'estimation préalable de la taille des protéines à séparer. Ainsi, plus la masse est élevée, plus on utilisera un gel à domaine de fractionnement élevé : on pourra, par exemple, utiliser un "G-100" dans le cas d'une séparation de chaînes légères des IgG : PM = 40 000 et des IgG entières PM = 160 000.

Préparation du gel :

a) Afin d'obtenir un débit correct et une bonne séparation, le gel est mis à gonfler dans un grand excès de solvant. Pour les

Sephadex de type G-100 - 150 - 200, la durée de gonflement est de trois jours, à température ambiante. Au bout de ce temps, le gel est équilibré dans la solution-tampon choisie.

b) Le remplissage de la colonne est identique à celui des résines Sephadex étudié dans le chapitre précédent.

c) Le chargement en protéine de la colonne est fonction de la taille de cette dernière : pour une colonne de 1 m de hauteur et de diamètre : 2,5 cm, la quantité de protéine préalablement dialysée contre le tampon d'élution est d'au maximum de 300 mg, sous un volume de 5 à 10 ml.

d) La récupération des fractions se fait dans un collecteur de fractions par volumes de 2,5 ou 10 ml. La gel-filtration est effectuée dans tous les cas par voie descendante, en s'aidant ou non d'une pompe péristaltique débitant un volume de 5 à 10 mls/heure.

e) Après traçage de la courbe, soit manuellement, soit automatiquement, les fractions désirées sont prélevées puis réduites au volume de départ : volume de dépôt de l'échantillon contre du polyéthylèneglycol : ce temps est valable pour toutes les manipulations de chromatographie : les fractions protéiques ainsi obtenues sont alors étudiées au moyen d'une technique électrophorétique, immuno-électrophorétique ou toute autre technique.

ELECTROPHORESE PREPARATIVE -

Cette technique est une variante préparative de l'électrophorèse qualitative. Elle peut se faire sur tout substrat neutre électriquement : papier, agar, agarose, amidon, Pevikon (copolymère d'acétate et de chlorure de polyvinyle), Géon (chlorure de polyvinyle). Elle permet d'obtenir en quantités relativement importantes une ou des fractions protéiques à partir d'un mélange complexe : sérum, urine ou tout autre liquide biologique. A elle seule, cette technique ne peut généralement pas conduire à une séparation parfaite d'une protéine et doit être associée aux techniques de relargage ou celles de chromatographie ou de gel-filtration. Cependant, son pouvoir

de résolution est assez élevé et sa capacité de charge en protéine appréciable. Ses inconvénients sont, d'une part, un rendement assez faible : environ 60% et, d'autre part, la récupération de substrat : d'amidon, ou d'agar, lors de l'utilisation de ces derniers milieux. Nous avons utilisé pour l'étude des immunoglobulines l'électrophorèse préparative sur amidon.

MATERIEL :

Plaque de verre : 50 x 30 x 1 cm.

Cadre rectangulaire en matière plastique constitué de quatre barreaux. La surface de ce cadre est réglable par l'intermédiaire de vis.

Ponts de "Chamex".

Amidon : fécule de pomme de terre.

TAMPON et COLORANT :

- <u>Tampon</u> :	Véronal sodé	:	30 g.
	Acétate de sodium	:	20 g.
	ClH 0,5 N	:	40 ml.
	Eau distillée Q.S.P.	:	6000 ml.
	pH : 8,6		

Le tampon est utilisé pour les bacs et pour mettre l'amidon en suspension.

- <u>Colorant</u> :	1) solution saturée de Cl_2Hg	
	Cl_2Hg	300 g.
	Ethanol 95°	1000 ml.
	2) Bleu de Bromophénol	1 g.
	solution saturée de	
	Cl_2Hg Q.S.P.	100 g.

TECHNIQUE :

Pour un bloc de 50 x 30 x 1 cm, on lave 1,2 kg d'amidon dans un Erlenmeyer de 5 litres par deux fois 4 litres d'eau distillée en éliminant à chaque fois le surnageant. On lave ensuite par

4 litres du tampon. Pendant les lavages successifs, on prépare le moule : après avoir vérifié l'horizontalité de la plaque de verre, on applique étroitement par collage le cadre sur sa surface ; puis on insère aux deux extrémités de la plaque de verre, le long du petit côté du cadre et entre les deux côtés les plus longs, les ponts en tissu Chamex. On coule alors la suspension épaisse dans le moule en laissant le tampon en excès s'écouler par les ponts en Chamex. Le séchage est terminé lorsqu'une incision faite dans l'amidon au moyen d'une lame de bistouri laisse une fente dont les bords ne s'effondrent pas (durée 3 à 4 heures). On découpe ensuite la fente d'insertion de l'échantillon : 2 à 3 mm de largeur environ au 1/3 du bloc côté cathode. On enlève avec une spatule l'amidon de cette fente et on le mélange à l'échantillon de 10 à 12 ml dialysé au préalable contre le tampon. La pâte fluide obtenue est réintroduite dans la gouttière à l'aide d'une pipette Pasteur. On applique sur la surface de l'amidon une feuille de polyéthylène découpée aux dimensions exactes du moule, en évitant la formation de bulles d'air. La migration est réalisée alors, à 4°, pendant environ 24 heures sous une tension constante de 300 V (4-5 V/cm). La migration terminée, la feuille de polyéthylène et les ponts de Chamex sont enlevés. On applique alors sur la surface du bloc, et parallèlement au sens de la migration, trois bandes de papier Whatman N°1 de 1 cm de large équidistantes les unes des autres. Les bandes s'imprègnent de protéines et en réalisent une empreinte. Après 5 minutes, les bandes sont mises à colorer pendant 10 minutes, décolorées dans l'acide acétique à 2% ; enfin, la coloration est fixée quelques instants dans le méthanol. Une fois sèches, les empreintes sont placées sur le bloc, les bandes intéressantes sont découpées, placées dans un becher et agitées en présence de 50 ml de sérum physiologique qui réalise l'élution. La suspension est filtrée à travers une fiole de Büchner, centrifugée, concentrée, dialysée, puis lyophilisée si nécessaire.

FRAGMENTATION DES IMMUNOGLOBULINES -

Comme nous le verrons ultérieurement, les immunoglobulines possèdent une structure complexe tétracaténaire, et l'utilisation d'enzymes protéolytiques permet l'obtention de "fragments" d'immunoglobulines. Ces derniers ont été utilisés dans ce travail pour

étudier les parentés antigéniques existant entre les immunoglobulines et certains fragments et chaînes d'immunoglobulines urinaires.

1°) PROTEOLYSE :

PRINCIPE :

La fragmentation par la papaïne a été étudiée par PORTER (119). On utilise un composé insoluble : la mercuripapaïne en suspension à 70% dans l'éthanol en présence d'agents stabilisants : l'EDTA et le chlorhydrate de cystéine. Les liaisons préférentiellement hydrolysées sont celles qui impliquent les acides aminés basiques ou la leucine ou la glycine. L'attaque protéolytique se fait, comme nous le verrons, au niveau de la "région charnière" de l'immunoglobuline conduisant à la production de fragments : Fab, Fc et F'c.

TECHNIQUE :

Dans un premier flacon, on introduit le volume désiré d'IgG à 20 mg/ml en tampon phosphate de sodium 0,2M ; pH = 7. Dans un second flacon, on introduit un volume égal au premier flacon de tampon phosphate de sodium 0,2M pH = 7, contenant : EDTA = 0,005M et ClH-cystéine = 0,01M (molarités calculées sur la base du mélange des flacons I et II), puis une quantité de mercuri-papaïne correspondant à 1% de la quantité de protéine. Les deux flacons sont alors mélangés et placés pendant 24 heures dans un bain marie à +37°. Au bout de ce temps, la réaction est stoppée par dialyse plusieurs fois contre un grand volume d'eau bi-distillée.

2°) SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES FRAGMENTS :

PRINCIPE :

Elle consiste, dans un premier temps, à éliminer par gel filtration sur G-100, les IgG résiduelles non protéolysées, puis dans un second temps à réaliser une séparation chromatographique sur résines échangeuses d'ions : DEAE-cellulose, des fragments Fab et Fc.

TECHNIQUE :

Après dialyse du mélange Fab + Fc + IgG contre un tampon phosphate 0,005 M pH = 8, on passe le mélange sur une colonne de Sephadex G-100. On ne retient que le second pic qui contient : Fab + Fc. Après récupération du mélange Fab + Fc, ce dernier est passé sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée en tampon phosphate 0,005M pH = 8 ; le premier pic qui est élué correspond au Fab. On introduit alors dans la colonne le même tampon dans lequel on ajoute NaCl pour obtenir une concentration finale : 0,3 M : le pic élué à cette molarité contient le Fc.

- REDUCTION DES IMMUNOGLOBULINES -

PRINCIPE :

L'action d'agents réducteurs, tels que le β -mercapto-éthanol sur les molécules d'immunoglobulines conduit à la rupture des ponts disulfuré : (cystéine-cystéine) qui relie chaîne lourde et chaîne légère. Après réduction, les cystéines libres sont bloquées par un agent alcoylant tel que le monoiodoacétamide qui empêche la réoxydation des molécules de cystéine entre-elles. Après rupture des liaisons covalentes par réduction, les chaînes lourdes et légères sont encore reliées entre-elles au moyen de liaisons multiples électrovalentes ou hydrogène ; ces liaisons sont rompues en dialysant le mélange réduit dans un milieu acide : acide propionique 1 M, puis les chaînes lourdes et légères sont séparées par gel-filtration en milieu acide.

TECHNIQUE :

La solution d'immunoglobuline à utiliser est comprise entre 10 et 20 mg/ml, en tampon TRIS ClH 0,55 M pH = 8,2

a) Réduction :

Elle est réalisée en ajoutant à la solution d'immunoglobuline une concentration en mercaptoéthanol de 0,1 M, qu'on laisse en contact de 16 à 20 heures à la température du laboratoire.

b) Alkylation :

Le flacon contenant le produit réduit est placé dans un bain de glace à 0° ; dans un second flacon, on dissout dans environ 2 ml de tampon TRIS une quantité de monoiodoacétamide (MIA) correspondant à un excès de 10% de β -mercaptoéthanol. Le produit est refroidi jusqu'à 0°, puis versé en une seule fois dans le premier flacon. L'alkylation se fait à froid (0°), sous agitation, et en maintenant le pH constant à 8,2 par addition de soude. Après environ 30 minutes, la réaction est terminée.

c) Séparation des chaînes :

Elle est réalisée sur une colonne de Sephadex G-100 a. propionique 1 M, après dialyse du produit réduit contre une solution d'acide propionique 1 M pendant 2 jours. Après récupération des pics de protéines, les solutions sont concentrées contre du Carbowax 20 M en suspension dans l'acide propionique 1 M, puis dialysées contre de petits volumes d'eau distillée. Afin d'éviter une précipitation brutale des chaînes par dialyse contre de grandes quantités d'eau physiologique, la remise en solution 0,15 M NaCl est réalisée par mélange volume à volume à +4°C : (généralement 0,1 ml) de NaCl 0,3 M et des chaînes lourdes et légères séparées, afin d'obtenir une solution finale de NaCl 0,15 M.

C- APPLICATION DES TECHNIQUES PREPARATIVES A LA SEPARATION DES
IMMUNOGLOBULINES PLASMATIQUES URINAIRES ET DES PROTEINES
" NON IMMUNOGLOBULINES " URINAIRES

Les techniques décrites précédemment ont été utilisées pour la séparation des immunoglobulines plasmatiques urinaires et des protéines urinaires "non immunoglobulines".

ISOLEMENT DES IMMUNOGLOBULINES, DES FRAGMENTS ET DES CHAINES -

1°) PLASMA OU SERUM :

a) IgG normales :

Elles sont isolées par passage de sérum humain normal sur DEAE-cellulose en tampon phosphate Na 0,005 M pH = 6,5. A ce pH, les IgG ne sont pas retenues par la résine et sont donc isolées à l'état pur sans contamination par les IgA, IgM et les autres globulines.

b) IgG "myélomateuses" :

Elles sont isolées dans un premier temps par électrophorèse préparative, suivie de chromatographie sur DEAE-cellulose comme ci-dessus, pour éliminer les traces éventuelles de protéines contaminantes.

c) IgA :

Elles ont été préparées à partir de sérums de sujets myélomateux riches en IgA, par électrophorèse préparative dans un

premier temps, puis par chromatographie sur DEAE-cellulose d'abord en tampon phosphate 0,005 M pH = 6,5, puis augmentation par paliers successifs de la molarité.

d) IgM :

Elles sont préparées à partir de sérums de sujets atteints de maladie de Waldenström, dont le sérum contient une quantité importante d'IgM monoclonale. Le premier temps de la préparation consiste en une électrophorèse préparative sur amidon, qui permet d'obtenir l'IgM, contaminée le plus souvent par des IgG. Dans un second temps, une gel-filtration sur Sephadex G-200 sépare dans le premier pic l'IgM, alors que les IgG sont retrouvées dans le second pic.

e) Fragments Fab et Fc :

Comme nous l'avons déjà vu, les fragments Fab et Fc d'IgG sont préparés à partir d'IgG normales par protéolyse sous l'action de la mercuripapaïne, suivie de gel-filtration sur Sephadex G-100, pour éliminer les IgG résiduelles non protéolysées, puis par chromatographie sur DEAE-cellulose, qui permet l'obtention successivement du Fab et du Fc.

f) Chaînes lourdes et légères :

Elles sont obtenues après réduction-alkylation par le β -mercaptoéthanol, suivie de dissociation des chaînes en milieu acide et séparation sur Sephadex G-100 en milieu acide.

2°) URINES :

a) La séparation des immunoglobulines à partir de l'urine consiste dans un premier temps à isoler la totalité des protéines urinaires ; ceci peut être réalisé par lyophilisation après dialyse pendant une semaine de l'urine contre de l'eau distillée, soit après précipitation par $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ (50). Dans ce dernier cas, l'urine, au préalablement filtrée à $+4^\circ\text{C}$, est additionnée d'un antiseptique : azothydrate de sodium à 1/10 000. Le pH est amené à 4,5. On ajoute à l'urine, par petites quantités, un égal volume d'une solution saturée

de sulfate d'ammonium pour obtenir une saturation (50). Lorsque les volumes sont très importants, on ajoute directement à l'urine, par petites fractions, le sulfate d'ammonium jusqu'à atteindre une concentration de 3 M. Quelle que soit la méthode utilisée, la précipitation se fait sous agitation électromagnétique. Le précipité est laissé à déposer à +4° pendant une nuit, puis centrifugé à 4 000 tours/minute. Le précipité est repris dans une quantité minimum d'eau distillée et placé dans un boyau de dialyse. La dialyse est réalisée contre de grands volumes d'eau distillée à +4°, renouvelés quotidiennement jusqu'à élimination totale du sulfate d'ammonium, constatée au moyen d'une solution de Cl_2Ba , ou en suivant la résistivité des bains de dialyse successifs. La solution protéique est ensuite concentrée contre du polyéthylèneglycol, puis lyophilisée. La précipitation par ce sel en milieu acide permet la récupération de la quasi-totalité des protéines urinaires. La séparation des immunoglobulines entières ou de leurs fragments et chaînes est réalisée par électrophorèse préparative, chromatographie sur DEAE-cellulose et sur Sephadex G-100 en tampon phosphate 0,005 M pH = 8.

b) La séparation des protéines urinaires "non immunoglobulines" est réalisée soit à partir des protéines lyophilisées, séparées par précipitation avec le sulfate d'ammonium, soit directement à partir de l'urine concentrée ou lyophilisée. Les étapes de séparation ultérieure utilisent les techniques déjà décrites d'électrophorèse, chromatographie et gel-filtration.

PREPARATION DES IMMUNSERUMS SPECIFIQUES
DES IMMUNOGLOBULINES.

ANIMAUX -

Les animaux utilisés dans la préparation des immunosérums sont des lapins. Nous n'avons pas observé de différences sensibles, selon la race des lapins, sur la production et la qualité des immunosérums fournis ; aussi, nous utilisons des animaux mâles ou femelles, sans race précisée, et d'un poids minimum de 1,500 kg.

INJECTIONS ET PRELEVEMENTS -

Il n'existe pas de protocole standard pour l'immunisation de l'animal. Nous n'avons pas observé de différences majeures dans la production et la qualité de l'immunosérum pour les voies d'injection suivantes : intra-musculaire, sous-cutanée, ou intra-veineuse. Dans la plupart des cas, le schéma suivant a été adopté :

Injection intra-musculaire dans la cuisse de 1 ml de solution protéique en eau physiologique avec un volume égal d'adjuvant de Freund complet. La concentration protéique est de 5 à 10 mg/ml au minimum. Le rythme d'injection est de deux fois par semaine dans les premières périodes d'immunisation : après la première immunisation, le Freund complet est remplacé par l'adjuvant de Freund incomplet. Après quatre ou cinq injections, le lapin est prélevé puis l'immunosérum contrôlé en immuno-électrophorèse. Si l'immunosérum est jugé satisfaisant, les injections sont arrêtées.

Un procédé d'immunisation plus efficace est celui qui consiste à injecter le ou les antigènes dans les coussinets plantaires par voie intradermique : par cette voie, la stimulation antigénique est très efficace. On injecte 0,1 à 0,2 ml de solution antigénique à 10 mg/ml émulsionné dans un volume égal de Freund complet. Une semaine plus tard, on poursuit les injections comme dans le procédé décrit pour la voie intra-musculaire. Les prélèvements de contrôle : 5 ml de sang, ou les prélèvements par grandes quantités, 50 ml, sont réalisés par coupure au bistouri de la veine marginale de l'oreille ou plus rarement par ponction cardiaque, deux jours suivant la date de la dernière injection.

-PREPARATION DES IMMUNSERUMS -

a) Immunsérum humain total :

L'animal est injecté avec du sérum humain normal par voie intra-musculaire. Dans des conditions d'immunisation normale, l'antisérum est valable après une vingtaine d'injections.

(N.B. Dans notre travail, nous avons utilisé également un immunsérum de cheval antisérum humain (CROIX-ROUGE HOLLANDAISE-AMSTERDAM) qui révèle très bien les Ig et les chaînes légères d'Ig).

b) Immunsérum anti-IgG :

L'animal est immunisé avec des IgG humaines, par voie intra-musculaire. D'un point de vue général, l'immunisation est plus rapide et plus efficace lorsque l'animal est sollicité par une seule protéine : aussi, la production d'anticorps est-elle plus précoce et plus puissante dans le cas de l'anti-IgG. Toutefois, l'apparition d'anticorps dirigés contre une protéine aussi complexe qu'une immunoglobuline varie avec le temps. C'est ainsi que les premiers anticorps obtenus chez l'animal vis-à-vis d'une Ig sont dirigés contre les déterminants : "lourds". En bref, un anti-IgG "récent" est soit anti- γ , soit anti-Fc. Plus tardivement, apparaissent les anticorps dirigés contre les chaînes légères de l'Ig. Il faut cependant remarquer que, même lorsque la préparation de protéine immunisante apparaît pure avec les critères préalables d'électrophorèse ou d'immuno-

électrophorèse, il apparaît dans le temps des anticorps dirigés contre une ou des protéines qui "n'étaient pas" initialement présentes dans la préparation : l'animal est donc très sensible à la présence de protéines ou de substances antigéniques en quantités très faibles.

c) Immunsérums anti-IgA et IgM :

Ces immunsérums ont été obtenus par injection de "para-protéines" IgA ou IgM. Les préparations de ces protéines étant souvent contaminées par des traces d'IgG, les immunsérums obtenus sont fréquemment anti- γ . D'autre part, du fait de la communauté de structure des immunoglobulines au niveau des chaînes légères, les anti-IgA ou anti-IgM révèlent en pratique constamment les IgG lorsqu'ils sont testés en immuno-électrophorèse : les IgG sont en effet les premières protéines que rencontre l'immunsérum lors de sa diffusion.

d) Immunsérums anti-Kappa et anti-Lambda :

Ils sont obtenus par injection à l'animal de chaînes légères : Bence-Jones urinaires de type Kappa ou Lambda, par voie intra-musculaire. L'obtention d'anti-Kappa est en général plus aisée que l'anti-Lambda ; les chaînes légères Lambda paraissent de ce fait moins antigéniques que les chaînes légères Kappa.

e) Autres immunsérums :

Le protocole d'immunisation est généralement le suivant : 1ère immunisation dans deux coussinets plantaires de 2 à 5 mg de protéine émulsionnés dans un volume égal d'adjuvant de Freund complet, suivie d'injections bi-hebdomadaires intra-musculaires.

ABSORPTION DES IMMUNSERUMS -

Le comportement de chaque immunsérum dépend, non seulement de la nature des protéines injectées, mais encore de ou des

absorptions effectuées sur l'immunsérum : ainsi, un immunsérum anti-IgG préparé avec les seules IgG, faciles à obtenir, ne nécessite pas d'absorption : il sera alors, dans sa spécificité maximum, anti- γ ou Fc, anti-Kappa et Lambda, anti-Fab. Les immunsérums anti-IgA et IgM sont obtenus après injection de "paraprotéines" isolées IgA et IgM qui sont très rarement pures d'IgG. Les immunsérums sont alors absorbés par du sérum de cordon dépourvu d'IgA et d'IgM, mais non d'IgG. De ce fait, l'immunsérum se trouve épuisé en anti-chaînes légères, et l'immunsérum obtenu n'est qu'anti- α ou anti- μ .

TECHNIQUE :

Exemple d'absorption de sérum anti-IgA contenant des anticorps dirigés contre des protéines autres que les immunoglobulines : 1 ml d'antisérum est absorbé par 0,1 ml de sérum de cordon (dépourvu d'IgA et d'IgM) une heure à +37°, puis 12 heures à +4°. La solution est agitée pour faciliter le contact antigène-anticorps. le tube est centrifugé, puis le culot éliminé. Si le contrôle immuno-électrophorèse ne révèle plus que l'arc anti-IgA, l'absorption est convenable, sinon cette dernière est répétée par l'adjonction de petites quantités d'antigène. Ce protocole peut être appliqué à l'absorption de tout autre antisérum, et est très suffisant pour l'obtention d'immunsérums monospécifiques. Cependant, le fait d'être en aval du point d'équivalence Ag/Ac, c'est-à-dire en excès d'antigène, laisse dans le milieu une quantité d'antigène supérieure à celle requise pour l'absorption. Cet excès de protéine peut provoquer éventuellement la formation d'arcs de précipitation lorsque deux immunsérums sont juxtaposés, mais dans les conditions habituelles d'utilisation, où l'identification d'une protéine est faite avec un seul immunsérum, ces artefacts ne sont pas à redouter. De même, il n'est pas possible de mélanger deux immunsérums anti-Kappa et anti-Lambda rendus monospécifiques par absorption croisée.

CONSERVATION DES IMMUNSERUMS -

Ils sont conservés congelés à -30°, généralement sous de petits volumes, et additionnés d'azohydrate de sodium à 1/10000. Les congélations-décongélations ne provoquent pas de détérioration marquée des immunsérums.

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

A- LES IMMUNOGLOBULINES DE L'URINE DE SUJETS INDEMNES DE MALADIES MALIGNES : MYELOME MULTIPLE DES OS OU MACROGLOBULINEMIE.

ETUDE QUALITATIVE -

1°) SUJETS NORMAUX :

a) Les IgG, fragments et chaînes d'IgG de l'urine normale :

De nombreuses études ont été effectuées sur les "gamma-globulines" de l'urine normale. Toutes ont mis très tôt l'accent sur le nombre important d'arcs de précipitation observés en immuno-électrophorèse dans la zone gamma (24,28,91).

Cependant, la structure intime et le métabolisme des immunoglobulines étant mal connus, l'interprétation des arcs de précipitation est restée longtemps très hypothétique : les difficultés de ce problème étant augmentées par le fait que de nombreux immun-sérums anti-immunoglobulines se comportent différemment selon la nature de l'animal utilisé et le temps d'immunisation : c'est ainsi que certains immun-sérums sont capables de révéler soit un, soit deux et jusqu'à 4 arcs dans la zone des immunoglobulines.

Certains auteurs, en utilisant des immun-sérums incomplètement spécifiques de la zone gamma, ont obtenu des arcs de précipitation jusqu'en zone β avec des protéines sans lien avec les immunoglobulines, telles la transferrine, l'hémopexine, ou bien encore des protéines de la zone α_2 - β présentes en quantité non négligeable dans l'urine normale.

Cependant, même en utilisant des immunosérums monospécifiques, la plupart des résultats montraient une multiplicité d'arcs de précipitation.

Il fallut attendre les travaux sur la structure chimique des immunoglobulines pour clarifier le problème : c'est ainsi qu'en 1963, BERGGARD et EDELMAN (8) montrent que l'urine physiologique contient des protéines qui sont la contrepartie normale des protéines de Bence-Jones et qui représentent en fait les chaînes légères libres des immunoglobulines : l'année suivante, TAKATSUKI et OSSERMANN (158) indiquent que les déterminants antigéniques Kappa et Lambda sont présents sur deux types de "gamma-globulines" de faible poids moléculaire dans l'urine normale.

Plus tard, un fragment apparenté cette fois à la chaîne lourde est mis en évidence dans l'urine normale (168,120,7). Alors que TURNER, POULIK et nous-mêmes (86) le considérons comme le fragment F'c, BERGGARD (7) assimile cette protéine au fragment Fc. Il semble improbable qu'en totalité le fragment lourd, mis en évidence dans l'urine, soit assimilable au fragment Fc.

En effet, le fragment F'c est le fragment le plus anodique des produits de protéolyse de l'IgG et le fragment "Fc urine" de BERGGARD est légèrement plus anodique que le fragment Fc produit par protéolyse enzymatique.

En fait, BIENENSTOCK (11) a montré que le fragment Fc existait dans l'urine normale dans des quantités moins importantes que le F'c ; c'est ainsi que le Fc n'est pas vu sur des urines concentrées 1 000 fois ; d'autre part, après marquage ^{131}I puis incubation de Fc avec un échantillon d'urine normale de 24 heures, les contrôles par autoradiographie indiquent la présence de F'c : le fragment Fc, apparu dans l'urine, est donc rapidement transformé en fragment F'c.

Mise en évidence des différents composants de l'urine normale :

L'étude a été entreprise d'une part sur vingt-sept sujets apparemment sains, ayant une protéinurie inférieure à 100 mg/litre, d'autre part sur des sujets dont la protéinurie se trouvait à la limite supérieure de cette protéinurie physiologique : 100 mg/litre.

Dans le premier cas, la concentration protéique a été augmentée 1 000 fois, dans le second cas la concentration protéique a été amenée à 30 g.°/°. Dans les deux cas, la concentration protéique finale varie entre 30 et 60 g./litre.

Les urines concentrées sont étudiées par immuno-électrophorèse au moyen des immunsérums suivants: -sérum anti-humain total (AMSTERDAM, lot PHO-11-P3) obtenu par immunisation du cheval ;

-anti- γ G (ROUEN Lot 406) obtenu chez le lapin : cet immunsérum met en évidence les IgG humaines, les fragments Fc et F'c, les chaînes légères Kappa et Lambda ;

-un immunsérum anti-urines : ce sérum a été obtenu après injection au lapin d'urines totales humaines lyophilisées : 80 litres d'urine humaine mâle sont dialysées contre de l'eau déminéralisée à +4°C, pH = 6, $p = 750 \text{ K}\Omega$ pendant 17 heures. Le dialysat est congelé, puis lyophilisé. Le lyophilisat est repris dans l'eau distillée, puis dialysé à nouveau et lyophilisé. Le protocole d'immunisation est celui étudié au chapitre "TECHNIQUES".

Les résultats obtenus (photo 1) avec l'immunsérum anti- γ G montrent de la cathode à l'anode, et en partant du réservoir d'anticorps : trois arcs approximativement de même mobilité électrique dont :

- deux arcs en voie de dissolution partielle ;
- un arc fin, très net, en parfait équilibre antigène/anticorps ;
- enfin, un arc en position α_2 .

Comme nous le verrons ultérieurement, ces quatre arcs sont parfaitement identifiables un à un, et assimilables aux IgG et à ses différents composants.

Les deux arcs en voie de dissolution sont des chaînes légères Kappa et Lambda. L'arc fin et net représente l'IgG complète. Les chaînes légères Kappa et Lambda sont systématiquement retrouvées dans les urines normales.

Enfin, l'arc en position α_2 représente le fragment F'c : la simple observation du cliché permet, sans préjuger de la nature exacte de cette protéine, de rattacher ce composant au moins à la partie lourde de l'immunoglobuline G : en effet, cet arc coupe et les chaînes Kappa et les chaînes Lambda ; donc, ce fragment ne peut avoir aucune communauté antigénique avec les chaînes légères de l'IgG ; en revanche, cet arc va confluer dans l'arc supérieur que représente l'IgG : cette dernière, cependant, forme un éperon sur le "fragment". Le "fragment" F'c se rattache donc partiellement à l'IgG, sans avoir aucune communauté avec les chaînes légères : ce fragment est donc apparenté partiellement aux chaînes lourdes. Avec notre immunsérum, ce fragment est retrouvé dans la presque totalité des urines étudiées.

La photo II montre ce que l'on obtient au moyen d'un immunsérum total. Deux arcs sont nettement identifiables dans la zone gamma : l'un est une chaîne légère, le second flou et peu important représente l'IgG ; l'arc F'c n'est pas ici identifiable de façon certaine, car l'arc très long en position α_2 n'est pas apparenté aux immunoglobulines. On peut donc déjà remarquer l'importance de la "spécificité" des immunsérums dans l'identification des composants des immunoglobulines.

Au moins deux facteurs peuvent être responsables de ces faits :

- le premier concerne le nombre de déterminants antigéniques contre lesquels l'animal peut s'immuniser ; il est possible qu'une quantité limitée de ces "déterminants" antigéniques puisse favoriser la formation d'anticorps puissants, ceci peut être le cas, lorsque l'animal est immunisé avec une seule protéine, comportant évidemment un nombre limité de sites antigéniques : par exemple, injection au lapin d'IgG. En revanche, dans le cas de l'immunsérum total, l'animal reçoit un nombre considérable de protéines, la formation d'anticorps peut être alors rendue difficile ;
- Le second a trait aux différences de catabolisme des protéines chez l'animal ; on peut imaginer que les étapes intermédiaires

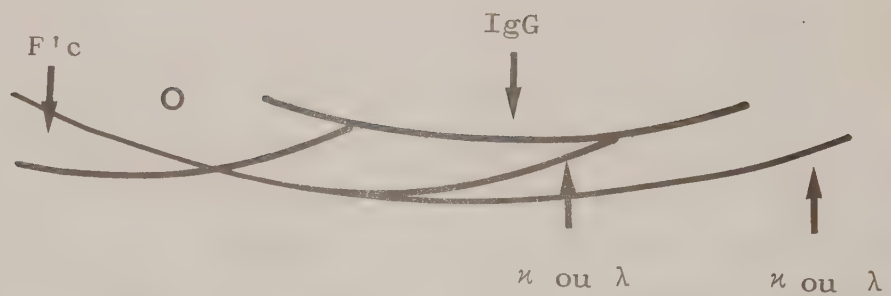
+



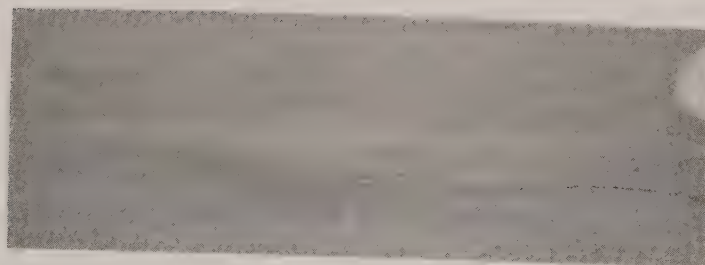
-

PHOTO I : Zône des immunoglobulines :
urine normale concentrée 1 000 fois.
Anti-IgG.

CROQUIS I :



+



-

PHOTO II : Urine normale concentrée 1 000 fois en haut.
Sérum humain normal en bas.
Antisérum humain total de cheval.

du catabolisme différent d'un animal à un autre et que certains "sites cachés" dans la molécule entière puissent se révéler et favoriser la formation d'anticorps.

La présence du fragment F'c, des chaînes légères et de l'IgG est constante chez les individus normaux ; nous verrons, dans le chapitre "ETUDE QUANTITATIVE" l'importance de l'excrétion de certains de ces constituants.

Le problème de la présence du fragment Fab dans les urines normales ou pathologiques a suscité certaines controverses dûes au comportement contradictoire de cette protéine in vivo et in vitro.

Bien que certains auteurs (116a) laissent entendre qu'il peut être rencontré dans l'urine, d'autres comme J.M. VAUGHAN (173) nient la présence du fragment Fab.

L'utilisation d'un immunsérum anti-Fab est insuffisante pour affirmer la présence du fragment dans l'urine, cet immunsérum réagissant en effet toujours contre les chaînes légères Kappa et Lambda qui sont présentes dans l'urine, comme nous l'avons vu. VAUGHAN en revanche, en utilisant un anti-Fd de γ G, n'a jamais obtenu de réaction positive, ce phénomène peut s'expliquer aisément par le fait que le temps de demi-vie du Fab chez l'homme est extrêmement court.

Le Fab et le $F(ab')_2$ sont dégradés in vivo si rapidement qu'ils ne peuvent apparaître, alors, dans une forme immunochimiquement identifiable dans l'urine.

Tout différent est le comportement des fragments Fab, Fc et F'c, lors de la protéolyse in vitro.

Nous avons entrepris une étude de protéolyse sur des IgG normales, d'une part en utilisant la fragmentation au moyen de la mercuripapaïne en présence de cystéine dans les conditions habituelles, d'autre part en réalisant une protéolyse dans les mêmes conditions, mais en milieu faiblement acide : pH = 5.

Les résultats obtenus montrent que dans les conditions habituelles de protéolyse, on obtient des fragments Fab, Fc et F'c, mais qu'en milieu acide, les fragments Fc et F'c sont détruits, en ne laissant que du Fab (photo III).

Une immuno-diffusion (photo IV) réalisée au moyen d'un immunsérum anti-IgG polyspécifique montre que la protéine qui subsiste est bien le Fab et non le Fc ou F'c, cette protéine en effet coupe le fragment Fc et est en communauté antigénique contre le Fab.

Cette étude est en accord avec celle de H. BENNICK (6) sur le sort des fragments F'c et pF'c.

Après attaque enzymatique des IgG en présence de papaïne et cystéine, cette étude montre que le F'c et le pF'c sont des intermédiaires semi-stables dans le processus de dégradation du fragment Fc.

Cependant, aucun de ces fragments n'est capable de résister à une exposition prolongée à l'enzyme, contrairement au Fab et $F(ab')_2$ qui apparaissent être stables quand ils sont incubés avec l'enzyme pendant des périodes longues.

Cette résistance du Fab à l'attaque enzymatique in vitro prolongée ou en milieu acide, et la persistance des fragments Fc et F'c sont donc en totale contradiction avec les résultats obtenus in vivo.

On pourrait imaginer alors que les enzymes, ou du moins les processus de dégradation in vivo, sont entièrement différents des mécanismes employés in vitro.

- Conjointement à l'étude immuno-électrophorétique et immuno-chimique des Ig urinaires, 27 sérums et urines de sujets apparemment en bonne santé ont été étudiés en parallèle (132) vis-à-vis des facteurs Gm(1,2,4,8,10,11,17,27); Inv(1 et 2) et ISf(1).

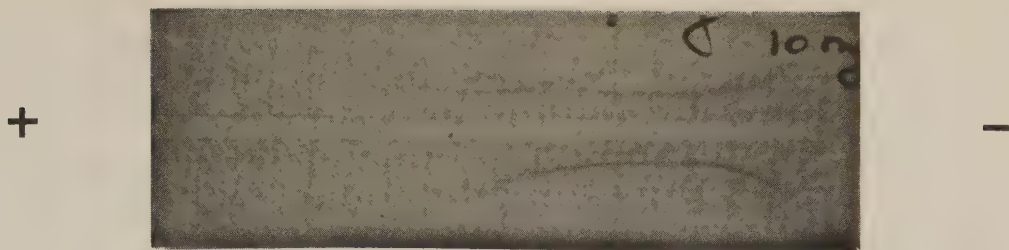


PHOTO III : Immuno-électrophorèse de fragments d'IgG humains.
Réservoir du haut : fragments Fab, Fc et F'c réalisés par protéolyse classique.
Réservoir du bas : fragment Fab seul après protéolyse en milieu acide.
Gouttière centrale : immunsérum anti-IgG.

CROQUIS II :

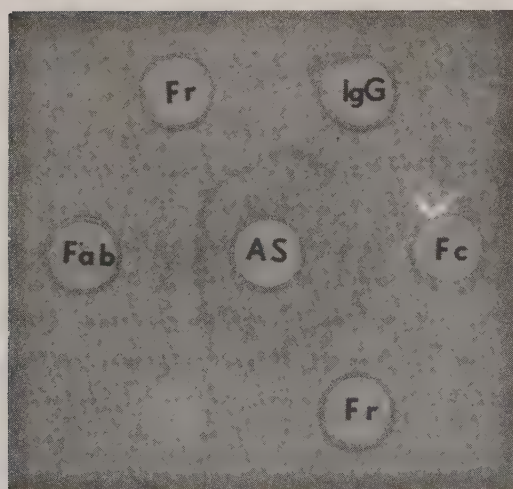
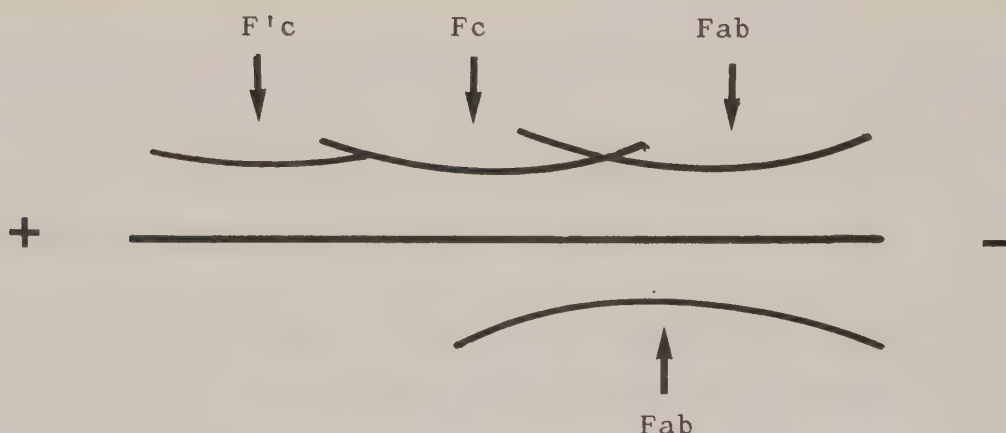


PHOTO IV : Fc = fragments Fc. Fr = fragments obtenus après protéolyse acide. Fab = fragments Fab.
 AS = anti-IgG (anti-Fab + Fc + F'c).

Parmi les différents facteurs étudiés, certains sont spécifiques des chaînes lourdes de γG_1 Gm(1), Gm(2), Gm(8), ISf(1) qui sont retrouvés sur le fragment Fc, et Gm(4), Gm(17) sur le fragment Fab. D'autres allotypes sont spécifiques des chaînes de γG_3 et, particulièrement, du fragment Fc, Gm(5,10,11,21).

Les deux facteurs du système Inv sont spécifiques des chaînes légères de type Kappa.

Les résultats obtenus montrent que dans les 27 cas, tous les facteurs présents dans le sérum sont retrouvés dans l'urine.

Le titre inhibiteur pour chaque urine varie en fonction du facteur recherché et est variable, selon l'urine étudiée, pour une même spécificité puisqu'il oscille par exemple du 1/4 au 1/16 pour le facteur Gm(4), ou du 1/16 au 1/512 pour le facteur Gm(17).

Les titres inhibiteurs, obtenus dans 26 cas, n'ont jamais atteint les titres d'inhibition sérique ; dans un cas, les taux d'inhibition, pour chacun des facteurs, ont atteint ceux du sérum ; en fait, cette dernière urine provient d'un sujet atteint d'une infection rénale récente.

La présence des facteurs des systèmes Gm et ISf démontre l'existence, dans l'urine normale, des immunoglobulines de type γG_1 et γG_3 .

La présence dans l'urine des Ig de type γG_2 ne pourrait être confirmée que par l'utilisation d'un immunsérum précipitant anti-Gm(23), facteur supporté par le fragment Fc des γG_2 .

Si l'existence dans l'urine de ces molécules ne fait pas de doute, aucun argument ne nous permet de dire s'il s'agit de la molécule entière ou des fragments de chacune d'entre-elles.

En effet, pour toutes les urines, les inhibitions constatées ne permettent pas de conclure à l'exclusion de facteurs supportés par un seul des fragments, dans le cas des γG_1 .

Mais, étant donné qu'aucun des fragments Fab ou Fc n'est trouvé dans les urines physiologiques, les spécificités précédentes sont vraisemblablement supportées par les YG entières.

En outre, l'étude des taux d'inhibition démontre qu'il n'existe pas de prépondérance d'un type de chaînes lourde par rapport à l'autre.

Les facteurs du système Inv objectivent la présence de chaînes légères de type Kappa.

Il s'agit des chaînes légères combinées entrant dans la constitution des YG entières ou des chaînes légères Kappa libres.

b) Les IgA et IgM de l'urine normale :

a) Très tôt, après la mise en évidence et l'identification de l'IgA dans le sérum humain, cette protéine fut retrouvée dans l'urine normale (112).

Beaucoup plus récemment, J.R. POORTMANS (116a) a déterminé sa concentration chez dix sujets sains. La moyenne obtenue en mg/24 heures est de 0,5 mg, soit une concentration environ 4 000 fois moindre que la concentration sérique. Cette protéine qui se présente en majorité sous la forme 7 S peut affecter des degrés de polymérisation variés, ce qui réduit d'autant sa possibilité de passage à travers la membrane glomérulaire.

Nous avons personnellement toujours retrouvé cette immunoglobuline en immuno-électrophorèse, sur des urines concentrées 1 000 fois en présence d'un immunsérum anti- YA.

Elle est, comme nous le verrons dans l'analyse des différents types de protéinurie, pratiquement constamment présente dans toutes les urines pathologiques, également dans la protéinurie d'effort.(12).

En 1965, TOMASI (166) montrait que l'IgA de la salive et du colostrum sont semblables, mais différents de l'IgA sérique par

un coefficient de sédimentation plus élevé et un déterminant antigénique supplémentaire.

L'IgA de la salive peut être dissociée en deux composants distincts antigéniquement, par réduction avec le mercaptoéthanol ou seulement au moyen d'agents dissociants.(67).

Un des constituants est semblable immunochimiquement à l'IgA sérique ; le second, appelé "pièce de transport" ("T pièce" des anglo saxons), est présent dans la salive de sujets qui n'ont ni IgA sérique, ni salivaire ; cette protéine n'a aucun rapport avec les chaînes légères des Ig ou avec les chaînes lourdes alpha.

Il est possible de fabriquer un immunsérum anti-IgA de sécrétion par utilisation de olostrum humain à partir duquel on extrait l'IgA de sécrétion.

BIENENSTOCK (12) a rapporté la présence de l'IgA de sécrétion dans l'urine humaine, la "pièce de transport" libre est également trouvée dans les urines normales, y compris les urines de sujets hypogammaglobulinémiques ; elle est présente également dans les urines de certains enfants et fœtus, même en l'absence du matériel à transporter : l'IgA (126).

Nous avons fabriqué un immunsérum anti-IgA de sécrétion à partir de lait maternel riche en cette protéine.

L'isolement de cette protéine se fait en utilisant les sels de zinc, qui comme l'a montré HEREMANS (73) ne précipitent pas les IgA.

La technique de BURTIN utilise dans un premier temps une précipitation par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 40% de saturation.

Le précipité repris par l'eau distillée est dialysé pendant deux jours contre de l'eau physiologique, puis traité par $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Zn}$ 1 M, en maintenant le pH à neutralité, et la température entre 25° et 30°.

Le surnageant de précipitation qui contient l'IgA est dialysé jusqu'à élimination du sel de zinc, puis concentré ou lyophilisé.

Un lapin a été immunisé avec l'IgA de lactosérum; après huit immunisations, l'animal a été injecté avec une IgA séparée d'un sérum de myélome IgA.

Cet immunsérum donne deux arcs de précipitation lorsqu'il est testé vis-à-vis de γ A de sérum normal, mais l'absorption de cet immunsérum par du sérum normal ne laisse subsister aucun arc de précipitation lorsqu'il est testé vis-à-vis de lactosérum humain concentré.

Nous n'avons donc pu obtenir un immunsérum suffisamment actif contre l'IgA de sécrétion et la pièce de transport.

b) La présence de l'IgM dans l'urine normale n'a jamais été signalée.

La masse moléculaire très importante de cette protéine $PM = 10^6$ d'une part, et la concentration faible de cette immunoglobuline dans le sérum sanguin en moyenne 1g/litre, d'autre part, sont des facteurs qui empêchent sa mise en évidence dans l'urine.

Une protéine de telle masse moléculaire ne peut être retrouvée dans l'urine, sauf, comme nous le verrons, dans les cas où la concentration sérique des IgM est élevée, par exemple dans la maladie de Waldenström, dans certaines cirrhoses et dans les cas où la membrane glomérulaire a été lésée.

Nous n'avons personnellement jamais retrouvé de γ M dans l'urine normale concentrée 1 000 fois ; cependant, POORTMANS (114) signale avoir retrouvé dans l'urine de sujets ayant effectué une course de marathon, des IgM qui semblent être de faible PM et appartenir aux fragments de cette molécule, soit $Fc\mu$, soit $Fab\mu$.

La molécule d'IgM (95) possède une structure très complexe: elle est formée de cinq sous-unités reliées entre elles par l'extrémité C-terminale de leurs chaînes lourdes μ . Au microscope électronique

la molécule se présente avec une partie centrale très dense, d'où partent cinq branches qui constituent chacune une sous-unité. La complexité structurale de cette protéine la rend assez peu antigénique, et il est possible que certaines portions "cachées" de la molécule ne puissent provoquer la formation d'anticorps chez l'animal.

Nous avons essayé alors de chercher s'il n'était pas possible de rencontrer, dans les urines, des fragments plus courts de la molécule en fabriquant des immunosérums à partir d'IgM réduite, c'est-à-dire, dissociée en chaînes lourdes et légères.

Par analogie, nous avons remarqué qu'un immunosérum anti-IgG est, en début d'immunisation, anti-chaîne lourde, mais non anti-chaîne légère, ce qu'il ne devient que beaucoup plus tardivement ; ainsi, le pouvoir immunogène des différentes parties de la molécule d'IgG étant variable, il se pourrait qu'il en soit de même pour l'IgM et que des immunosérums, fabriqués à partir de protéines réduites, puissent mettre en évidence des parties de la molécule.

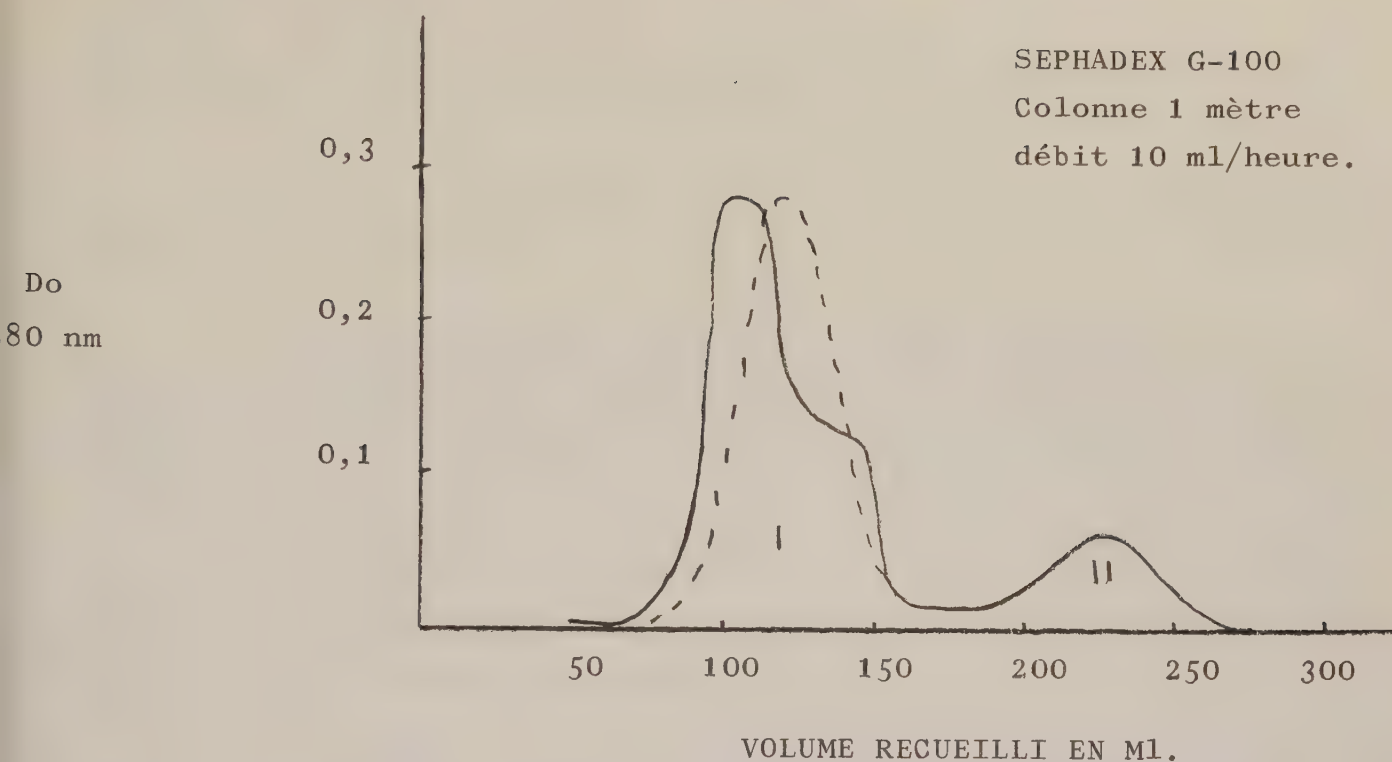
Nous avons, dans un premier temps, isolé une macroglobuline IgM de type Kappa, à partir du sérum d'un sujet atteint de maladie de Waldenström.

Cette séparation (cf. Techniques) comporte, dans un premier temps, une électrophorèse préparative et, dans un second temps, une filtration sur Sephadex G-200. Le premier pic apparu contient la γ M qui est exclue dans ce type de gel. La γ M est ensuite réduite par le mercaptoéthanol et les chaînes lourdes et légères obtenues, séparées sur colonne de Sephadex G-100 en milieu dénaturant: a. propionique 1 M. Chaque pic est recueilli, dialysé en tampon NaCl 0,15 M, puis analysé en immuno-électrophorèse et immuno-diffusion vis-à-vis d'immunosérums anti- μ et anti-Kappa.

La courbe d'enregistrement à 280 nm (croquis N°3) montre que la réduction de la γ M produit deux pics I et II (croquis N°3).

Dans les conditions de réduction utilisées, le pic I peut affecter deux aspects : l'un représenté en trait plein comprend une partie ascendante puis un épaulement.

Croquis N°3



- Séparation sur Sephadex G-100 -

acide propionique 1 M de chaînes lourdes et légères d'IgM.

L'analyse immunochimique de ce pic réalisée avec un anti- μ montre qu'il contient une partie de γ M réduites, ceci est mis en évidence sur la photo IV.

La partie A correspond à la γ M, la partie B aux chaînes lourdes et la γ M réduite.

Le plus souvent, la réduction est totale (courbe I en pointillé) l'exclusion de la protéine hors du gel est plus lente.

L'immuno-électrophorèse ne montre que la partie A correspondant aux chaînes lourdes μ .

L'immuno-diffusion réalisée avec un anti- μ confirme la présence de chaînes lourdes dans I.

La γ M témoin forme un arc dont la concavité est dirigée vers le réservoir d'antigène ; de plus, la protéine est peu diffusible, ces deux caractères étant dûs au PM élevé de la protéine; en revanche, le pic I qui contient les chaînes lourdes μ ou les sous-unités forme un arc droit, équidistant des réservoirs antigène-anticorps.

Le pic II, en revanche, ne contient que les chaînes légères de la molécule.

L'immuno-électrophorèse ne révèle aucun constituant lorsque l'on utilise un immunsérum anti- μ ; en revanche, les chaînes légères Kappa de la protéine sont révélées par l'immunsérum anti-Kappa.

L'immuno-diffusion (photo VI) avec ce même immunsérum révèle les chaînes légères Kappa dans le pic II, arc de précipitation très près du réservoir antigène.

Lorsque le pic I incomplètement réduit est testé, on peut encore mettre en évidence les chaînes légères dans la protéine (photo VI).

Trois lapins sont alors injectés contre chacune des fractions : deux, avec la fraction légère, un avec la fraction lourde ; les deux animaux immunisés avec la fraction légère fournissent un immunsérum qui est avant tout anti-chaîne légère Kappa et faiblement anti- μ .

Le lapin, en effet, parvient à s'immuniser contre de toutes petites quantités de protéines qui restent indétectables par les méthodes usuelles telles que l'immuno-électrophorèse ou l'immuno-diffusion.

De même, le sérum animal, anti-chaîne lourde, est très fortement anti- μ , mais également anti-chaîne légère, du fait de la présence de petites parties IgM ou de sous-unités très incomplètement réduites.

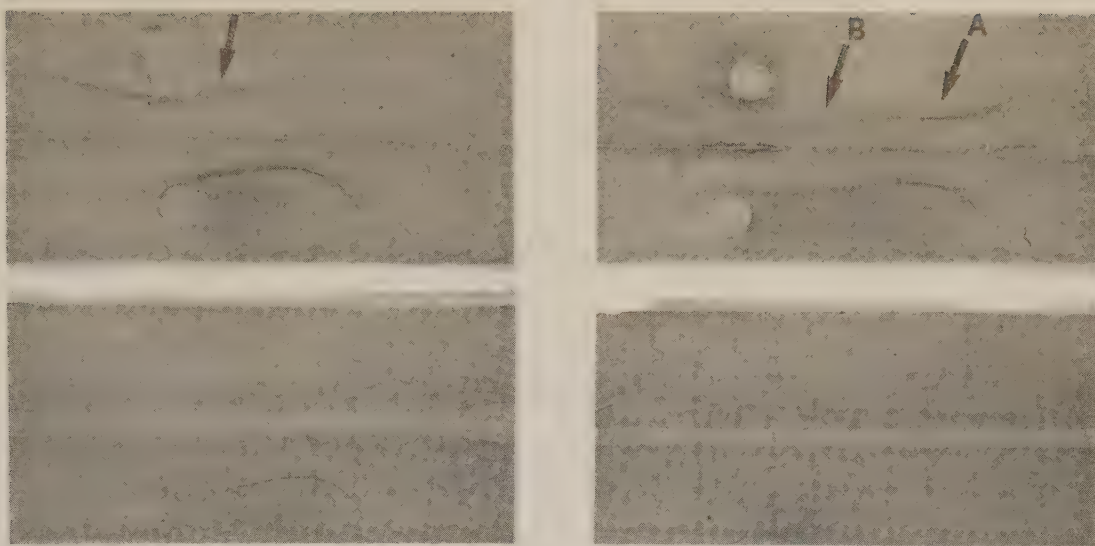


PHOTO V : de gauche à droite et de haut en bas : - pic I : IgM totalement réduite - témoin IgM - pic I : IgM réduite incomplètement - témoin IgM - pic II - témoin IgM - pic II - témoin IgM. (voir le texte).

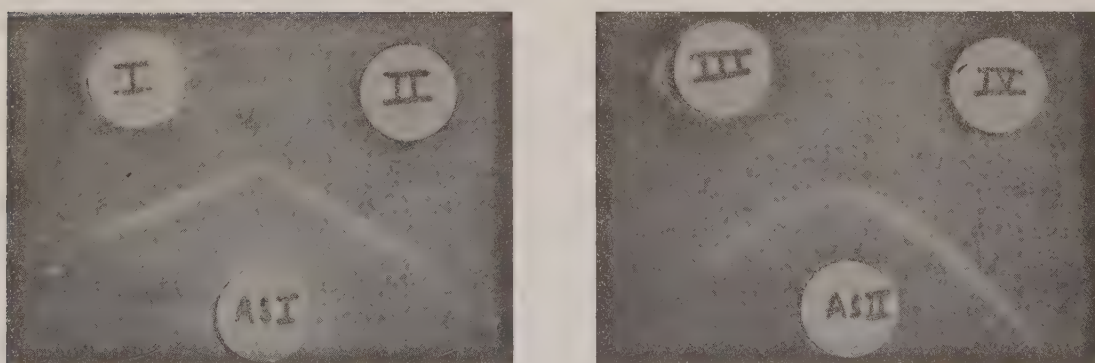


PHOTO VI : I : IgM complète. II : chaînes lourdes d'IgM
 III : pic I : IgM réduite incomplètement. IV : pic II.
 ASI : anti- μ . ASII : anti- κ . (Voir le texte).

De toute façon, les immunsérums obtenus comportent donc des anticorps dirigés contre les parties diverses de la molécule d'IgM : parties légères et lourdes de la molécule d'IgM.

Afin de supprimer les réactions croisées contre les IgG et chaînes légères de l'urine, les immunsérums sont absorbés par des γ G et des chaînes légères Kappa et Lambda : 1 ml de chaque antiserum est absorbé simultanément par 5 mg d'IgG, 5 mg de chaîne légère Kappa et 5 mg de chaîne légère Lambda.

50 mg d'urine normale lyophilisée, provenant de 80 donneurs sains, sont dissous dans 1 ml de NaCl 0,15 M et sont analysés en immuno-électrophorèse et immuno-diffusion, au moyen de ces immunsérums parallèlement à l'immunsérum anti-IgM préparé chez le lapin par injection avec des IgM normales.

Aucun de ces immunsérums ne révèle d'IgM ou de protéines apparentées à l'IgM, dans l'urine normale.

Nous verrons ultérieurement que la recherche de tels fragments est négative également chez les sujets qui présentent une protéinurie anormale. Lorsque, dans de rares cas, l'IgM est présente, il s'agit d'IgM totale chez des malades ayant soit une concentration sérique élevée d'IgM, soit une atteinte glomérulaire.

2°) SUJETS ATTEINTS D'AFFECTIONS RENALES :

Les immunoglobulines dans les atteintes glomérulaires :

La membrane glomérulaire se comporte comme un filtre moléculaire, en formant un ultra filtrat du plasma sanguin (69).

A l'état normal, cette membrane est un obstacle difficilement franchissable par les protéines puisque seulement environ 0,20 g/litre de protéines sont retrouvés dans le filtrat glomérulaire.

La "sélectivité" de cette membrane se trouve diminuée dans la plupart des formes de glomérulite : selon l'importance de l'atteinte

de la membrane glomérulaire, cette dernière est capable de retenir ou non les protéines sériques.

L'apparition de protéines d'un PM élevé correspond, en général, à une atteinte du glomérule.

A l'inverse, dans le syndrome néphrotique où un certain degré de sélectivité de la membrane persiste, le glomérule laisse passer plus volontiers les petites molécules que les grosses.

REVILLARD et MANUEL (127) ont été les premiers à appliquer les techniques d'électrophorèse et d'immuno-électrophorèse à l'étude des protéinuries et à les classer selon l'aspect des tracés obtenus.

Une interprétation valable des tracés, dans les conditions usuelles d'utilisation des immunosérums, peut être faite après concentration des urines à une valeur d'environ 30 g. protéines/litre.

Dans la protéinurie "d'origine glomérulaire" (87,127), les tracés se rapprochent beaucoup de ceux donnés par le sérum, mais les aspects rencontrés sont très divers.

On peut distinguer ainsi :

- 1- le tracé dit "sélectif" qui comporte en électrophorèse sur gel d'amidon, deux fractions prépondérantes : l'albumine et la sidérophiline; les variations quantitatives de cette dernière sont généralement parallèles à celles de l'albumine. En immuno-électrophorèse, il est possible également de mettre en évidence deux ou trois globulines α_1 , mais peu d' α_2 . Parmi les immunoglobulines, seules les γ G, qui peuvent parfois passer inaperçues, sont détectées en très faible proportion.
- 2- Le tracé non sélectif qui comporte la plupart des protéines détectées habituellement dans le sérum humain sans distinction de taille moléculaire, il est cependant très rare que ces tracés comportent des protéines de PM très élevé, comme les γ M ou les lipoprotéines α_2 et β .

Il existe en réalité de nombreux intermédiaires parmi les tracés "non sélectifs" et "sélectifs".

Ils pourront se différencier par leur teneur relative en composants de plus en plus lourds comme l'immunoglobuline γA ou α_2 macroglobuline.

On pourra parler dans ce cas de tracés moyennement sélectifs ; il est des cas, cependant, où il est très malaisé de trouver une frontière exacte entre "protéinurie sélective et non sélective".

Ceci peut se produire lorsque les arcs obtenus en immuno-électrophorèse et les bandes en électrophorèse sont peu nets.

Quand on sait que, pour des concentrations même assez éloignées, il n'existe pas de différence notable dans l'aspect des arcs et des bandes, il devient très difficile de trancher pour l'un ou pour l'autre type de tracé.

- 3- Un troisième type de tracé est celui qui comporte d'une façon prépondérante les protéines retrouvées dans les "protéinuries non sélectives" auxquelles s'ajoutent une ou plusieurs protéines détectées dans la "protéinurie tubulaire" ceci est le cas, en particulier, pour les chaînes légères d'immunoglobulines.

Il faut signaler, enfin, que la sélectivité est indépendante de la quantité de protéines excrétées.

a) Les Ig dans la "protéinurie sélective" :

L'étude par électrophorèse et immuno-électrophorèse des urines de "syndrome néphrotique" amenées à une concentration en protéines de 30 g°/‰ donne des images très pauvres dans la zone des immunoglobulines.

1- Les IgG, chaînes et fragments :

La photo VII montre une immuno-électrophorèse réalisée au moyen d'un immunsérum total vis-à-vis d'une urine d'un syndrome néphrotique.

La zone des immunoglobulines, dans ces conditions, est très pauvre et ne révèle qu'un arc très peu important qui correspond aux IgG entières.

L'utilisation d'un immunsérum anti-Fc d'IgG et anti-chaînes légères révèle cette protéine qui doit donc être assimilée à des Ig entières.

L'augmentation de volume du dépôt d'urine (x 9) ou l'utilisation d'urine précipitée par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et étudiée à 50 g/litre révèle dans toutes les urines de "syndrome néphrotique", la présence d'IgG.

2- Les IgA ne sont généralement pas détectées par l'immunsérum humain total, dans ce type d'urines.

L'immunsérum spécifique anti-IgA, en revanche, plus puissant, donne une réaction faible avec ce type d'urines.

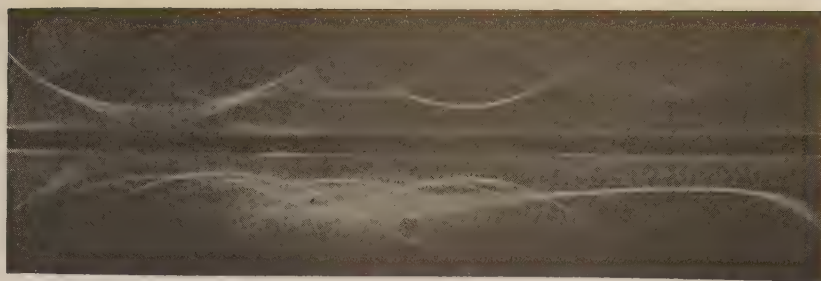
On peut estimer la teneur en IgA de ces urines de façon suivante :

Le seuil de détection limite de l'IgA, au moyen de notre immunsérum, en immuno-électrophorèse, par dilution successive de raison géométrique 1/2 du sérum normal, est égale à 0,280 g/litre : dans le tableau n°1, nous avons choisi trois urines de protéinurie sélective de concentration faible, moyenne et forte.

Dans chacune de ces urines, on peut mettre en évidence des IgA à la détection limite ; si on rapporte cette concentration protéique au "facteur de concentration" (volume auquel a été amené chaque urine pour obtenir 30 g/litre), on constate que le pourcentage d'IgA par rapport à la protéinurie totale est toujours

Anti-Sérum Total

A S T



A

A S T



B

Anti IgG

Anti Fc + F'c

+Chaines légères



C

PHOTO VII : A) Tracé de "protéinurie sélective" : IgG en très faible quantité.
B) Protéinurie non sélective : IgG, IgA, chaînes légères.
C) Protéinurie non sélective : mise en évidence de chaînes légères IgG et F'c par augmentation du dépôt d'antigène.
EN A et B, témoin : sérum normal.

	Protéinurie Totale g / litre	IgA mg /litre	% de la Protéinurie totale
Sujet A	0,80	$\frac{0,28}{47} = 5,95$	0,74
Sujet B	2,4	$\frac{0,28}{13} = 21,6$	0,9
Sujet C	0,27	$\frac{0,28}{111} = 0,250$	0,92

TABLEAU N° I : - Concentration des IgA et pourcentage par rapport à la protéinurie totale dans la "protéinurie sélective".
- Dans la deuxième colonne, le dénominateur représente le "facteur de concentration".

inférieur à 1, alors qu'il est d'environ 3,5 dans le sérum humain normal.

3- Enfin, il n'est jamais possible de révéler d'IgM dans ces types de protéinurie.

Les fragments d'IgG et les chaînes légères ne sont pas habituellement mis en évidence dans ces urines, même lorsque l'on augmente la concentration protéique ou le volume de la prise d'essai.

Toutefois, la présence de ces protéines dans l'urine de ce type de "filtration" ne peut être exclue, et s'explique facilement par l'importance relative des immunoglobulines dans les différents types de protéinurie.

En effet, (tableau II), si l'on choisit théoriquement deux protéinuries sélective et non sélective, respectivement de concentration de 10 g. et de 1 g. de protéine totale par litre, on obtiendra par le jeu des pourcentages, (environ 10% d'IgG pour une protéinurie non sélective, et 1% pour une protéinurie sélective), une quantité d'IgG identique pour chaque type de protéinurie : comme ces urines sont étudiées à une concentration de 30 g %/‰ le "facteur de concentration" varie d'ordre 10.

	Protéinurie g/litre	% IgG	Quantité IgG	Facteur de concentration	Quantité IgG g/litre
Protéinurie Sélective	10	1	0,1	X 3	0,3
Protéinurie Sélective	0,3	1	0,003	X 100	0,3
Protéinurie non Sélective	1	10	0,1	X 30	3
Protéinurie non Sélective	0,3	10	0,03	X 100	3

TABEAU N°II :

Pourcentage théorique des IgG dans les protéinuries sélective et non sélective, et quantité d'IgG par litre soumise à l'étude électrophorétique, après concentration des urines à 30 g/litre.

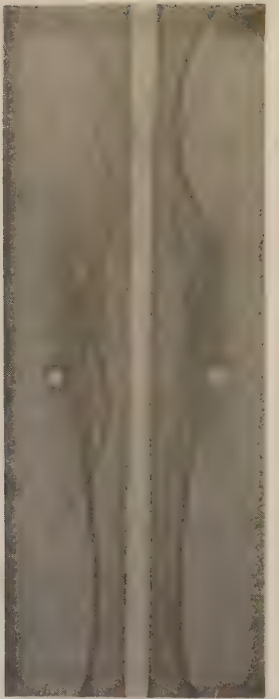
Après concentration des urines, la quantité par litre d'IgG sera de 0,3 g/litre pour la protéinurie sélective, et de 3 g/litre pour la protéinurie non sélective.

Or, en immuno-électrophorèse, 3 g/litre d'IgG sont très facilement détectables, et 0,3 g/litre ne le sont pas. '

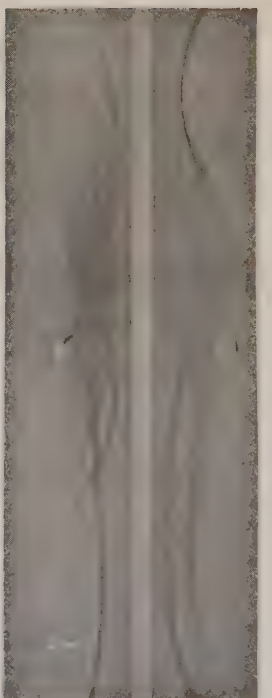
b) Les Ig dans la "protéinurie non sélective" :

Lors d'une atteinte glomérulaire importante ou d'une augmentation de la pression veineuse dans les veines rénales, la membrane ne peut plus jouer convenablement le rôle de filtre qui lui est dévolu : aussi, la plupart du temps, trouve-t-on dans ces cas, comme dans le cas de la protéinurie sélective, la non-sélectivité des tracés est indépendante de la quantité de protéine excrétée.

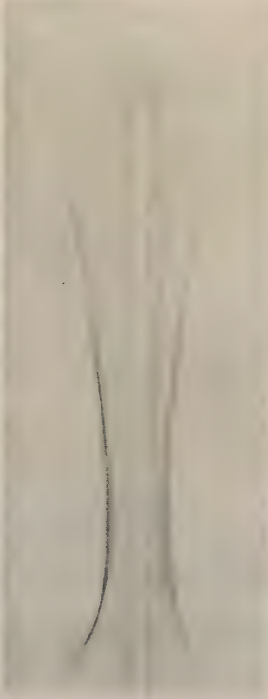
Si l'on considère les zones des globulines autres que les immunoglobulines, on peut constater (photo VII) qu'une grande partie des globulines y sont présentes : c'est ce que REVILLARD et



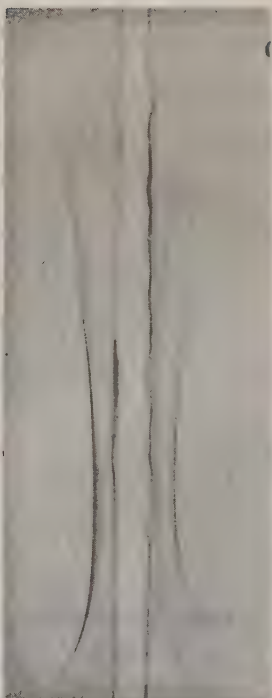
A S T



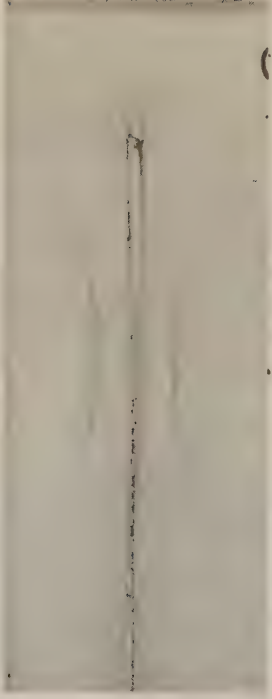
E



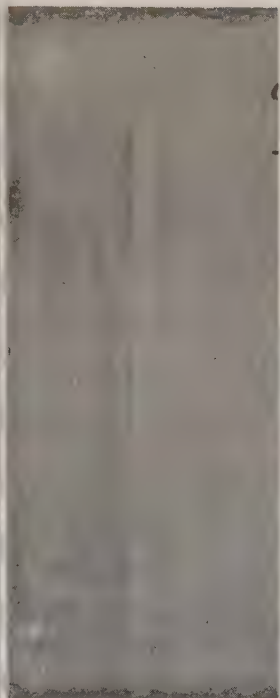
Anti-IgG



F



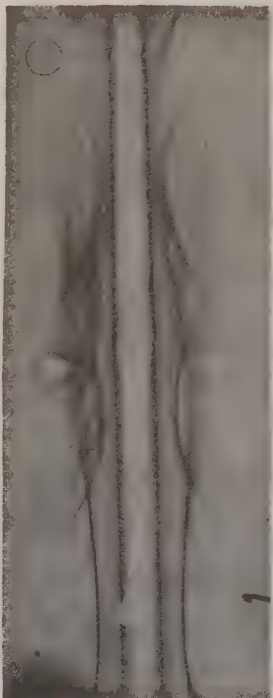
Anti-IgA



G



Anti-IgM
AST



H

PHOTO VIII :

A à D : protéinurie 4 g/litre : mise en évidence des IgG, chaînes légères, IgA, IgM.

E à G : protéinurie 0,20 g/litre : même malade : traces d'IgG, chaînes légères en quantité importante.

H : protéinurie non sélective "typique".

A à H : témoin : sérum humain normal en bas.

MANUEL appellent un aspect en "sérum dilué". Toutefois, il existe bien des intermédiaires entre ces tracés. On voit sur la photo VIII H un aspect voisin de celui que donne un sérum. La concentration protéique de cette urine, initialement de 5 g/litre, a été amenée à 30 g/litre. Dans d'autres urines (photo IX), les électrophorèses en gel d'amidon indiquent une proportion plus importante de sidérophiline, et plus faible de globulines α_2 : α_2M et haptoglobine.

Dans la région des immunoglobulines, les IgG et IgA sont présentes généralement. Nous verrons dans le chapitre suivant l'importance de l'excrétion des IgG dans les différents types de protéinurie. Pour les IgA, nous avons pu constater que le pourcentage d'excrétion par rapport à la protéinurie totale était variable mais pouvait avoisiner celui du sérum humain normal : dans de nombreux cas, l'excrétion des IgA par rapport à la protéinurie totale est proche de 3%, chiffre moyen comparable à la proportion des IgA sériques.

Les IgM, dans ces tracés, ne sont que rarement reconnues : lorsqu'elles sont présentes, fait très rare, leur présence coïncide avec une forte augmentation sérique : il est important d'ailleurs de remarquer que cette apparition d'IgM dans l'urine ne semble pas toujours dûe à une lésion proprement dite de la membrane glomérulaire qui permettrait un passage augmenté d'une protéine de fort PM. Nous avons ainsi pu constater chez un malade une protéinurie importante : 4 g/litre, constituée d'une quantité faible d'albumine, pas de sidérophiline, mais contenant en revanche une quantité importante d'IgG, IgA et IgM : dans cette urine, les chaînes légères sont également présentes, représentant environ 10% de la protéinurie ; comme nous le verrons plus tard, ces chaînes légères doivent représenter une part de ces protéines non réabsorbées au niveau tubulaire, à cause d'une saturation du Tm. On ne peut expliquer la présence des IgG, IgA et IgM, et même de l' α_2M , protéine également de fort PM que par une augmentation des processus de diffusion au niveau glomérulaire : le sérum correspondant révèle une augmentation importante des IgG, IgA et IgM qui explique la quantité importante de chaînes légères, rencontrées. Cependant, trente jours plus tard, la protéinurie est revenue à un taux inférieur à 0,20 g/litre : les IgA et IgM sont disparues, les IgG sont présentes en très faible proportion. Seules les chaînes légères et deux pré-albumines de faible PM sont mises en

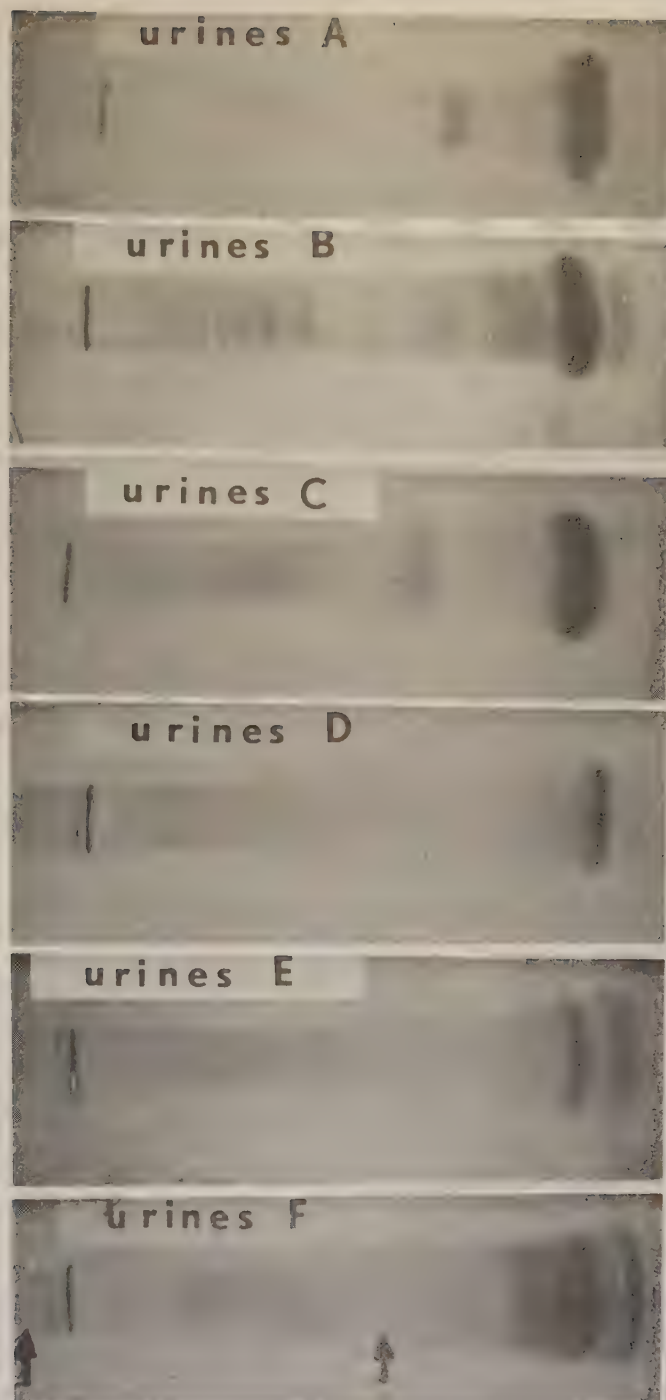


PHOTO IX : Electrophorèse en gel d'amidon : a = protéinurie sélective ;
 b et c : protéinuries non sélectives = sidérophiline plus
 abondante en c ; d : zone des Ig abondante = protéinurie
 4 g/litre ; e : même malade : protéinurie = 0,20 g/litre;
 f : "protéinurie tubulaire" à la reprise de diurèse.
 (voir texte). La zone des Ig est comprise entre les deux
 flèches.

évidence dans un tracé qui se rapproche étroitement des tracés de "protéinurie tubulaire", tels que celui vu sur la photo VIII et qui représente un tracé typique après reprise de diurèse sans atteinte glomérulaire : on peut, alors, penser qu'une lésion véritable de la membrane permettant le passage de protéines de fort PM est à exclure : on comprend mal, en effet, si tel était le cas, la réversibilité d'un tel processus en un temps si court.

Ces observations sont ainsi beaucoup plus en faveur de la théorie de la diffusion de CHINARD (20) que de celle de la membrane glomérulaire considérée comme un filtre.

Dans les conditions normales d'étude, c'est-à-dire en utilisant un immunsérum total de cheval, il n'est généralement pas possible de mettre en évidence, dans ces urines, de fragments ou de chaînes légères. Toutefois, les immunsérums spécifiques anti- γ G qui sont également anti-F'c, permettent de révéler très souvent ce type de fragment : lorsque le dépôt d'antigène est augmenté de 9 fois, le fragment F'c est pratiquement toujours reconnu (photo VII).

Il en est de même pour les chaînes légères qui sont parfois confondues avec l'arc des IgG, lorsque ces dernières sont augmentées.

Ainsi, fragment F'c et chaînes légères Kappa et Lambda sont donc toujours présents dans la protéinurie non sélective, soit à des concentrations faibles comparables à celles de l'urine normale et donc difficilement mises en évidence (mais, comme nous l'avons déjà vu, ce fait est à mettre sur le compte d'une réduction faible du volume de l'urine pour l'amener à une concentration de 30 g/litre), soit à des concentrations plus élevées : dans ce cas, cela peut correspondre à une augmentation importante des IgG sériques liée à une incapacité de réabsorption des chaînes légères par le tubule proximal. Mais, en aucun cas, même en présence d'une forte quantité d'IgG dans l'urine, on ne peut déceler parallèlement de quantités anormalement élevées de fragments Fc ou F'c, comme dans les maladies des chaînes lourdes gamma : ceci est bien en accord avec le fait que les IgG 7S natives ne sont pas aisément dégradées par les enzymes

urinaires, alors que le fragment Fc, dans les mêmes conditions, est progressivement transformé en F'c.

Ainsi, la présence du fragment F'c dans les urines consécutives à la dégradation du fragment Fc, paraît-elle due à une apparition de ce fragment en amont du glomérule, et non pas au niveau rénal. Cependant, il n'est pas possible de trancher définitivement pour une origine catabolique ou, au contraire, anabolique de ce fragment.

c) Les Ig dans la "protéinurie tubulaire" :

FRIBERG (53), puis BUTLER et FLYNN (17) ont montré que la protéinurie apparue chez des ouvriers, manipulant le cadmium, se distinguent des protéinuries d'origine glomérulaire. Ce type de protéinurie se rencontre également lors d'intoxications par la phénacétine ou la vitamine D.

Nous avons montré, récemment, que ceci était le cas également lors de traitements par la gentamycine.

Un certain nombre de maladies héréditaires qui affectent les tubules, comme la galactosémie congénitale, la maladie de Wilson, le syndrome de Dowe, le syndrome de Fanconi (40), comportent également ce type de protéinurie. Enfin, à la phase polyurique de la reprise de diurèse des insuffisances rénales aiguës, on retrouve également une protéinurie tubulaire. Celle-ci se caractérise, dans l'électrophorèse classique, par la présence d'une quantité élevée de protéines dans la zone α_2 et β_2 .

En électrophorèse sur gel d'amidon (photo IX), dans nos conditions techniques, deux à trois bandes en avant et en arrière de l'albumine sont mises en évidence : ce type de tracé, très évocateur, est encore appelé par certains le "triple trait".

En immuno-électrophorèse, le tracé également caractéristique (photo X) est très proche de celui obtenu avec les urines normales.

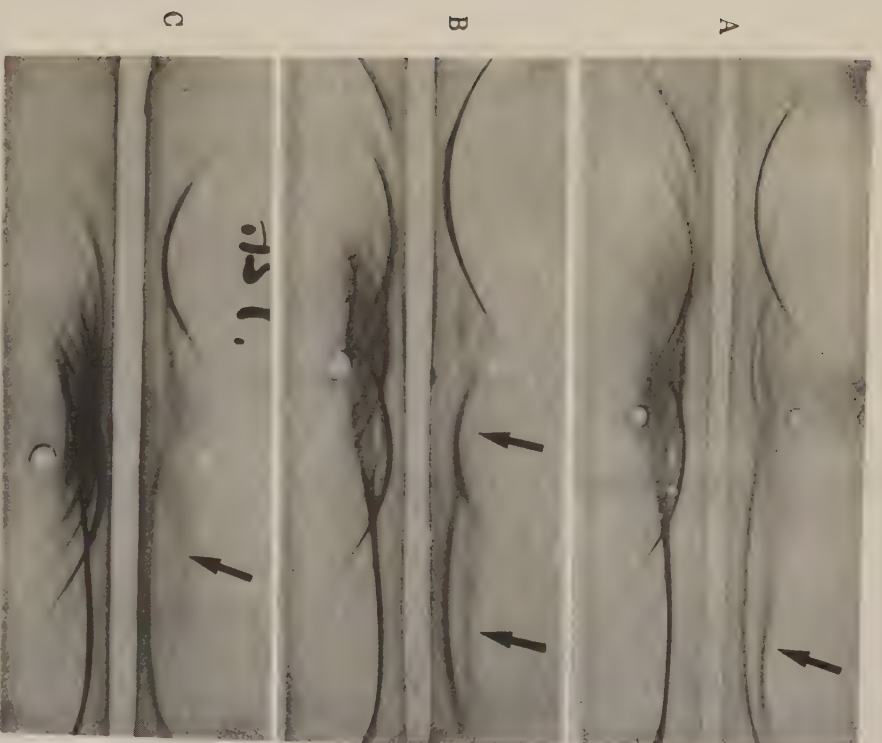


PHOTO X : Tracés de "protéinurie tubulaire".

- A : tracé typique.
 B : présence assez élevée de sidérophiline (flèche).
 C : quantité importante de chaînes légères.
 A à F : quantité faible d'IgG entières (flèches) par rapport aux chaînes légères, sauf en E.
 F : F'c, IgG (ouFc), chaînes légères : le sérum du sujet contient une quantité importante d'IgG, IgA et IgM.

Anti-IgG
 E (Anti-Fc+F'c
 +chaînes légères)

F

Beaucoup d'incertitude persiste encore, cependant, sur l'origine de ces protéines : un fait certain concerne leur PM faible, qui explique ainsi leur facilité de passage à travers le glomérule. La plupart de ces protéines proviennent du plasma où elles existent à l'état de traces. Toutes les protéines plasmatiques, détectées dans l'urine normale et la protéinurie glomérulaire, sont présentes dans la protéinurie tubulaire.

FLYNN et PLATT (47) n'ont rencontré que deux protéines de faible PM : l'une α_2 et l'autre β , qui ne seraient pas détectées également dans l'urine normale ; encore, ces auteurs émettent-ils l'hypothèse que ces protéines seraient, à l'état normal, complètement réabsorbées.

Les autres protéines présentes dans ce type d'urine proviendraient du tractus rénal, mais elles sont également détectées dans l'urine normale.

D'après FLYNN, la seule différence existant entre protéinurie tubulaire et protéinurie normale est la présence possible de protéines issues des cellules rénales et/ou une augmentation absolue de la quantité de protéines plasmatiques excrétées dans la protéinurie tubulaire.

La différence entre protéinurie tubulaire et protéinurie normale serait donc principalement d'ordre quantitatif et s'expliquerait par une diminution importante de la réabsorption au niveau du tubule proximal, dont du Tm des protéines de PM faible.

Le fait de retrouver, dans la protéinurie tubulaire, deux protéines qui sont absentes de l'urine normale, suggère à FLYNN que la réabsorption est sélective à l'état normal : or, les premiers travaux de HARDWICKE et SQUIRE (voir chapitre biochimie des protéines urinaires page 3) orientaient vers une non-sélectivité de réabsorption. Le problème est loin d'être tranché actuellement.

Il se pourrait également que, dans certains cas, des protéines de l'urine ne soient pas originaires du plasma, mais du rein lui-même ou même d'autres organes. Nous étudions, en effet,

actuellement, chez une femme apparemment saine, plusieurs protéines présentes dans son urine, mais absentes des urines normales glomérulaires et même tubulaires : par immuno-fluorescence, au moyen des immunsérums spécifiques de ces protéines, la fixation de ces immunsérums semble ne s'effectuer que sur les membranes basales tubulaires et le tissu interstitiel.

Quoi qu'il en soit, nous n'avons pas remarqué de différence qualitative notable entre protéinurie dite "tubulaire" et protéinurie normale. Nous n'avons étudié, le plus souvent, que des protéinuries de reprise de diurèse dont la concentration s'étagait entre 0,50 et 1,50 g/litre : au bout d'un temps plus ou moins long, cette protéinurie décline pour revenir à la normale sans modification particulière. Il semble bien donc qu'il n'existerait qu'une différence quantitative entre protéinurie "tubulaire" et normale, du moins dans la grande majorité des cas.

Ce type de protéinurie pourrait, alors, se rapprocher de celle que l'on rencontre après effort.

En effet, dans ces conditions, on peut mettre en évidence, dans l'urine, des protéines de PM faible comme dans la protéinurie tubulaire. POORTMANS (115) a émis l'hypothèse que, sous l'influence des catécholamines libérées pendant l'effort, le taux de passage du plasma à travers les glomérules serait très ralenti ; ce facteur, combiné avec des altérations dans la perméabilité des membranes capillaires, permettraient la diffusion de grosses quantités de protéines plasmatiques dans l'espace de Bowmann. Les protéines brutalement chassées par le flux urinaire qui devient très élevé, après effort, ne séjourneraient pas un temps suffisant dans les tubules pour être réabsorbées et seraient alors éliminées dans l'urine.

Comme nous l'avons vu, ces protéines avec les restrictions considérées ci-dessus, seraient donc très proches, sinon identiques à celles que l'on rencontre dans l'urine normale : la majorité des protéines "tubulaires" serait composée de protéines de PM peu élevé compris entre 20 000 et 40 000 et avec des coefficients de sédimentation de 2 à 2,5 S (14,148), comme celles de l'urine normale.

Parmi celles-ci, il est remarquable de constater la présence de certains composants des immunoglobulines. En effet, le fait le plus marquant, lors de l'étude des urines de tels sujets avec un immunosérum total ou avec un IS anti-IgG, est la présence en position gamma d'un arc long et accentué, très souvent dédoublé, proche du réservoir d'anticorps. (Photo X) ; parfois, on peut noter au-dessus de cet arc très long un autre plus court : cet aspect, sans prendre en considération les nombreuses protéines en position α_2 également caractéristiques de ces types de tracé, est très symptomatique de la "protéinurie tubulaire".

L'utilisation d'un IS anti-Fc ne révèle pas l'arc très long proche du réservoir anticorps ; en revanche, il met en évidence l'arc placé au-dessus de lui : nous verrons, lors de l'étude chromatographique de ces composants, que cette dernière protéine contient non seulement les déterminants lourds, mais les déterminants légers Kappa et Lambda : il s'agit donc d'une immunoglobuline entière IgG 7S; en revanche, l'arc très long réagit avec les immunosérums Kappa et Lambda : après séparation, ces protéines ne sont pas révélées par l'IS anti-Fc. Ces constituants sont donc des chaînes légères d'Ig kappa et Lambda.

Il est donc intéressant de noter que ces Ig font partie du "pool" de protéines de PM faible, habituellement normalement réabsorbées, mais qui ne le sont pratiquement pas lors de la protéinurie tubulaire.

Ces protéines représentent, de très loin, nous le verrons dans le prochain chapitre, la partie la plus prépondérante des Ig excrétées dans la protéinurie tubulaire. En revanche, la quantité d'Ig entières excrétées est beaucoup plus faible, mais toujours plus importante que dans la protéinurie sélective, même lorsqu'il n'existe pas d'atteinte glomérulaire.

On peut également, dans ces urines (photo X et XI), déceler le fragment F'c. Cependant, cette protéine existe en quantité très faible et ne peut être considérée comme un élément de différenciation avec les autres types de protéinurie, comme pour les chaînes légères.



PHOTO XI :
 A : IE de pic II (croquis IV) . B : IE de pic I . C : IE de pic II .
 D : IE de pic A (croquis IV) ; noter la légère contamination avec
 les IgG .
 E, F, G : IE du mélange des pics B, C, D (croquis) .
 H : mise en évidence d'IgG et F'c dans une protéinurie tubulaire .

Les IgA sont décelées également en faible quantité et seulement après augmentation importante du dépôt d'antigène : ainsi, la quantité d'IgA dans l'urine de "protéinurie tubulaire" est plus faible que celle de "protéinurie non sélective". Dans ce dernier cas, la quantité d'IgA atteint la moitié, ou souvent, égale la concentration sérique d'IgA.

Enfin, nous n'avons jamais mis en évidence d'IgM ou de protéine apparentée aux IgM dans ce type d'urine.

SEPARATION DES IMMUNOGLOBULINES DE LA "PROTEINURIE TUBULAIRE" :

Nous avons entrepris de séparer les différents constituants appartenant aux immunoglobulines, en nous attachant particulièrement aux chaînes légères.

Il nous intéressait, en effet, de doser ultérieurement les chaînes légères excrétées dans les différents types de protéinurie et nous désirions obtenir, à partir de ces chaînes légères libres, des immunsérums qui soient dirigés et contre les déterminants Kappa, et contre les déterminants Lambda : en fait, l'expérience prouve qu'on peut tout aussi bien utiliser un immunsérum anti-Kappa ou anti-Lambda, préparé à partir de "protéines de Bence-Jones". Un immunsérum préparé à partir de protéines individuelles (Bence-Jones) "reconnaissant" aussi bien le "site Kappa" ou le "site Lambda", qu'il soit sur des chaînes légères individuelles ou qu'il soit présent dans le pool des chaînes légères excrétées par l'urine.

L'urine utilisée provient d'une malade ayant subi une intoxication, après inhalation de trichloréthylène. L'urine a été prélevée à la période de reprise de diurèse.

Les tracés immuno-électrophorétique et électrophorétique montrent des aspects nets de protéinurie tubulaire avec augmentation importante des chaînes légères.

Les immunoglobulines sériques sont normales. Plusieurs échantillons ont été prélevés : la protéinurie varie entre 1 g. et 2,5 g/litre. L'ensemble des urines a été traité par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 3 M

(cf. Techniques), puis lyophilisé ; il n'apparaît pas de modification des protéines, après lyophilisation : ni la mobilité, ni l'aspect des arcs de précipitation ne sont affectés par la lyophilisation.

a) Préparation des IgG et des chaînes légères :

La séparation des Ig est réalisée en deux étapes : dans un premier temps, une chromatographie sur DEAE-cellulose permet d'obtenir le bloc IgG et chaînes légères, puis une filtration sur Sephadex G-100, dans un second temps, sépare les IgG des chaînes légères.

Chromatographie sur DEAE-cellulose :

Sur une colonne de 50 cm de hauteur, on applique une prise d'essai de 800 mg de protéine lyophilisée, sous un volume de 10 ml.

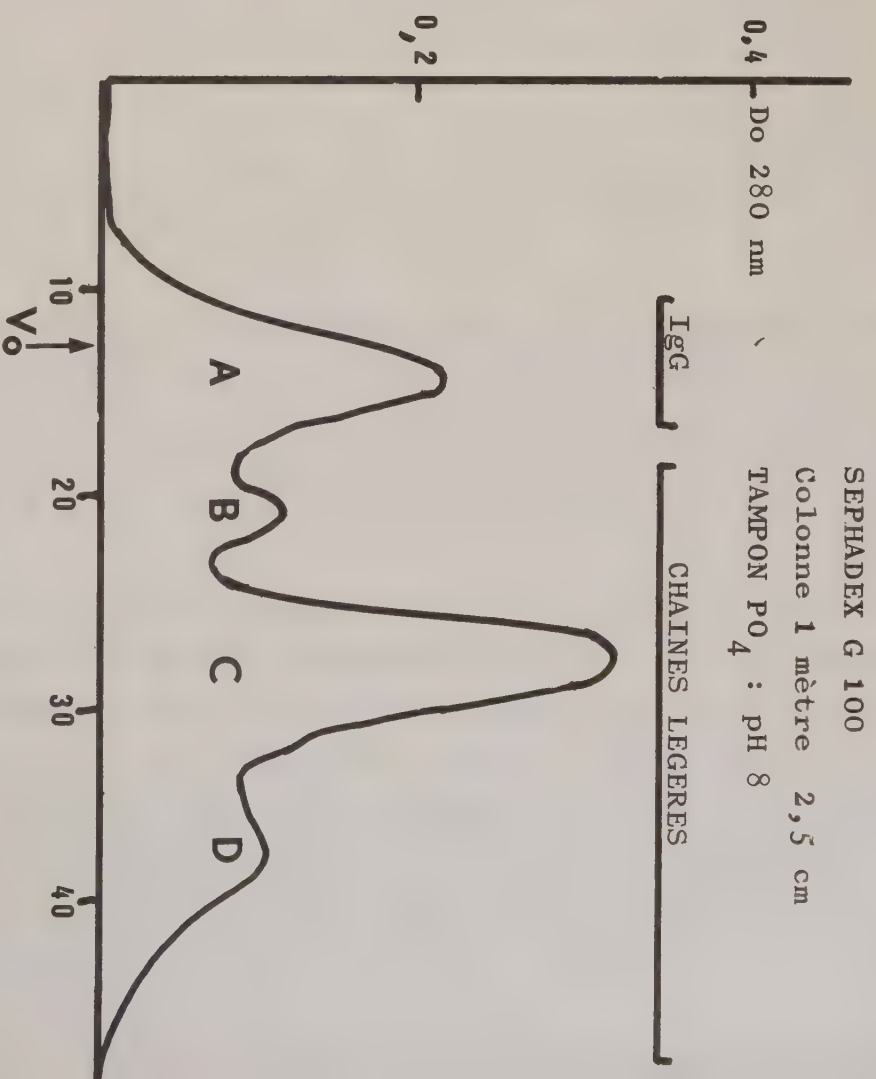
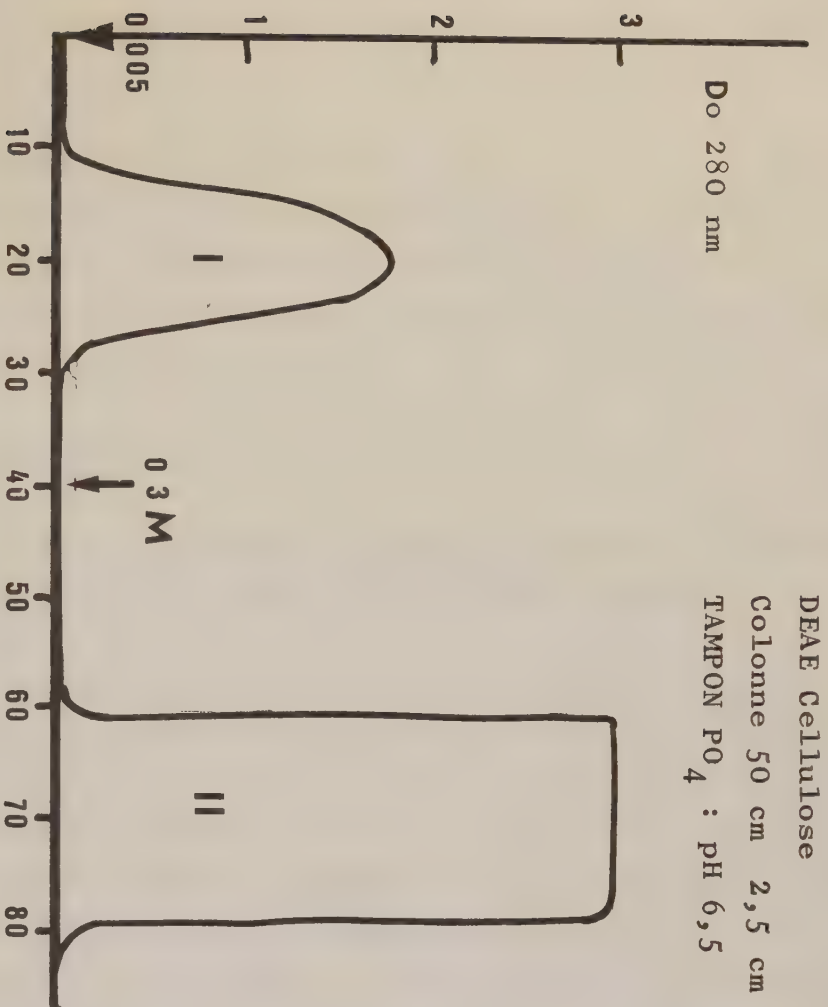
L'échantillon est préalablement dialysé contre un tampon phosphate sodium 5.10^{-3} M pH = 6,5. L'élution est réalisée au moyen de deux gradients : le premier, correspond au tampon d'équilibrage de la colonne : 5.10^{-3} M pH = 6,5, le second est un tampon de molarité élevée 3.10^{-1} M.

Un exemple typique de séparation sur un tel type de résine est montré sur le croquis IV.

Le premier pic contient IgG et chaînes légères, le second contient toutes les autres protéines sériques, y compris IgA et fragments F'c.

Sur 10 échantillons, la quantité du pic I, donc les IgG et chaînes légères, récupérée par rapport à la quantité totale de protéine utilisée, est d'environ 14%, et nous verrons ensuite que plus de la moitié de ces Ig est constituée par des chaînes légères : la photo XI montre le contrôle I.E. de ces séparations.

Le pic I de DEAE ne contient pratiquement que les chaînes légères et IgG, et nous n'avons pas identifié avec certitude l'arc



NOMBRE DE TUBES 10 ml / tube

NOMBRE DE TUBES 10 ml / tube

CROQUIS IV : A gauche, séparation du bloc IgG + chaînes légères sur DEAE-cellulose : 800 mg de protéines précipitées par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 3M. Deux gradients de molarité utilisés. Pic I retenu. A droite, séparation de I sur Sephadex G 100 : B, C et D contiennent les chaînes légères. A contient seulement IgG. C correspond à la forme dimère des chaînes L, D à la forme monomère, B à la forme tétramère (voir texte).

de la protéine qui coupe chaînes légères et IgG et qui peut être soit une fraction du complément, soit la β_2 macroglobuline de BERGGARD ; toutefois, d'une part cette protéine n'a aucune parenté avec les Ig puisqu'elle coupe IgG et chaînes légères, d'autre part elle n'est présente qu'en quantité très faible.

Gel-filtration sur Sephadex G-100 :

Lorsque le pic I, obtenu en DEAE-cellulose, est passé sur Sephadex G-100, on obtient quatre pics. (voir croquis IV)

Seul le premier pic ne contient que des IgG. Les pics B, C et D ne contiennent eux, que des chaînes légères Kappa et Lambda : on voit sur la photo XI l'analyse immuno-électrophorétique du mélange des pics B,C,D qui montrent exclusivement une réaction positive avec les IS anti-Kappa et anti-Lambda : l'aspect de la courbe indique également l'existence de degrés de polymérisation au niveau des chaînes légères, puisque le pic majeur C est entouré de deux pics moins importants B et D, qui contiennent également et uniquement des chaînes légères : ces courbes sont strictement reproductibles et ont été obtenues également avec d'autres malades montrant de la même façon une "protéinurie tubulaire" : Ces protéines et, en particulier les chaînes légères, se retrouvent quel que soit le processus pathologique ayant abouti à ce type de protéinurie.

Ces résultats sont confirmés par les travaux très récents de BERGGARD (9). Ce dernier, étudiant une protéinurie d'un malade ayant une maladie de Wilson, obtient un tracé sur Sephadex G-100 identique au nôtre : il montre également que ces diverses formes de C.L. ont tendance à s'associer et (ou) à se dissocier.

La forme monomère a un PM moyen de 26 000, la dimère de 40 000 et la tétramère de 80 000. BERGGARD démontre que les dimères (fraction C du croquis) se séparent sur Sephadex G-100 a.propionique en deux fractions : l'une qui reste stable, correspondant à la forme dimère, l'autre dissociée, correspondant à la forme monomère Il existe donc deux formes de dimères : l'une liée par des liaisons covalentes, l'autre formée de chaînes légères associées par des liaisons non covalentes.

La forme monomère stable (partie D de la courbe) et la forme monomère obtenue après séparation des formes dimères liées d'une façon non covalente, contiennent des chaînes légères Kappa en proportion beaucoup plus importante que la forme covalente de dimère qui contient Kappa et Lambda, en proportions égales.

Cependant, il n'est pas exclu, mais nous ne pouvons le démontrer d'une façon certaine, q'il existe dans de tels types d'urines des fragments de chaînes légères comme ceux décrits pour les protéines de Bence-Jones (21).

La distribution respective des diverses formes de chaînes légères est approximativement de 50% de dimères, 20% de monomères et 30% de tétramères.

Ces pourcentages sont obtenus à partir des fractions recueillies B, C et D du croquis.

Il faut remarquer que la porportion dimères/monomères, sur plusieurs urines, reste dans un rapport relativement constant.

b) Séparation des chaînes légères Kappa des chaînes Lambda :

Nous avons entrepris de séparer les chaînes Kappa des chaînes Lambda, en employant une modification de la technique de FRANEK (49) : cette technique a été utilisée pour l'isolement des chaînes Kappa et Lambda des IgG normales et est basée sur le fait que la partie constante des Kappa contient davantage d'acides aminés basiques que les Lambda ; de ce fait, ces dernières doivent se trouver éluées plus précocement que les Kappa lorsque l'on utilise un échangeur cationique très acide comme le S.E. Sephadex. Cependant, cette technique ne permet pas une séparation complète des formes Kappa et Lambda.

Technique utilisée :

Principe :

La séparation des chaînes légères Kappa et Lambda provenant d'une première séparation sur Sephadex G-100 est réalisée sur

une résine cationique SE-Sephadex C25 en milieu acide : pH = 3,0 et dénaturant urée 8 M. De ce fait, les éventuelles associations non covalentes Kappa-Lambda sont rompues.

L'élution des protéines est réalisée par augmentation par paliers de la molarité en tampon discontinu. Pour cette raison, deux tampons sont utilisés.

Matériel :

Colonne	h = 30 cm.	Ø Interne = 2,5 cm.
<u>Tampon N°1</u>	Formiate K	0,005 M
	Chlorure K	0,09 M
	Urée	8 M
	Eau distillée Q.S.P.	1 000 ml.
<u>Tampon N°2</u>	Formiate K	0,005 M
	Chlorure K	0,18 M
	Urée	8M
	Eau distillée Q.S.P.	1 000 ml.

Le pH est amené à 3,0, au moyen d'acide propionique pur.

Mode opératoire :

La résine est mise en suspension 3 fois successivement dans le tampon I, sans urée, puis versée dans la colonne, et équilibrée avec le tampon I contenant l'urée 8 M.

Lorsque la colonne est prête, 100 mg du mélange de chaînes légères Kappa + Lambda sont appliqués en haut de la colonne : le tampon I est alors passé dans la colonne.

Des fractions de 10 ml sont recueillies : chacune est lue au spectrophotomètre à 280 nm. Lorsque l'on est revenu à une Do nulle, le tampon II est passé dans la colonne. L'opération est terminée lorsque l'on obtient à nouveau une Do nulle.

Résultats :

Deux pics principaux (voir croquis V) et un troisième moins important sont obtenus.

Les contrôles I.E. par les immunsérums spécifiques montrent que les chaînes légères Lambda sont toutes séparées dans le premier pic, alors que les chaînes légères Kappa se retrouvent pratiquement pures dans les pics II et III ; cependant, le premier pic est contaminé par les chaînes légères Kappa. Il n'est pas possible, de cette façon, d'obtenir une préparation parfaitement pure de chaînes légères Lambda, celle-ci pourrait être obtenue éventuellement en diminuant la molarité du tampon I.

De toute façon, la présence de chaînes légères Kappa et Lambda dans des fractions différentes de l'élution de cette résine montre qu'il n'existe très probablement pas de chaînes légères hybrides Kappa-Lambda, liées par exemple au moyen de ponts disulfure, car le milieu dénaturant urée 8 M ne peut seulement que dissocier les liaisons faibles, mais non rompre les liaisons covalentes.

La présence d'une troisième fraction contenant des chaînes légères Kappa seules ne peut s'expliquer que par l'hétérogénéité chimique de ces immunoglobulines, responsable également de leur hétérogénéité électrophorétique.

c) Essai de séparation du fragment F'c:

Nous avons isolé un fragment F'c d'IgG à partir de l'urine d'un malade. Le sérum de ce sujet montre une hyper-gammaglobulinémie très prononcée, sans toutefois qu'on puisse déceler de "paraprotéine" au niveau des trois Ig.

La protéinurie varie entre 0,50 g et 0,80 g/litre. Elle se caractérise par la présence en quantité relativement importante de chaînes légères Kappa et Lambda, d'IgG totales qui paraissent en voie de protéolyse puisqu'un arc est présent en position Fc, enfin d'un arc F'c très net.

Il faut, dès à présent, remarquer que la présence dans l'urine de F'c en quantité importante, voire de Fc, n'est à mettre aucunement en parallèle avec la "maladie des chaînes lourdes γ " ; dans ce cas, le sérum contient toujours le "fragment" en quantité abondante. Il s'agit, comme nous le verrons en détail plus loin, d'un produit de synthèse indépendant et incomplet, alors que dans ce dernier exemple, la présence de F'c est due à un phénomène de protéolyse au niveau des IgG sériques, sans "paraprotéine".

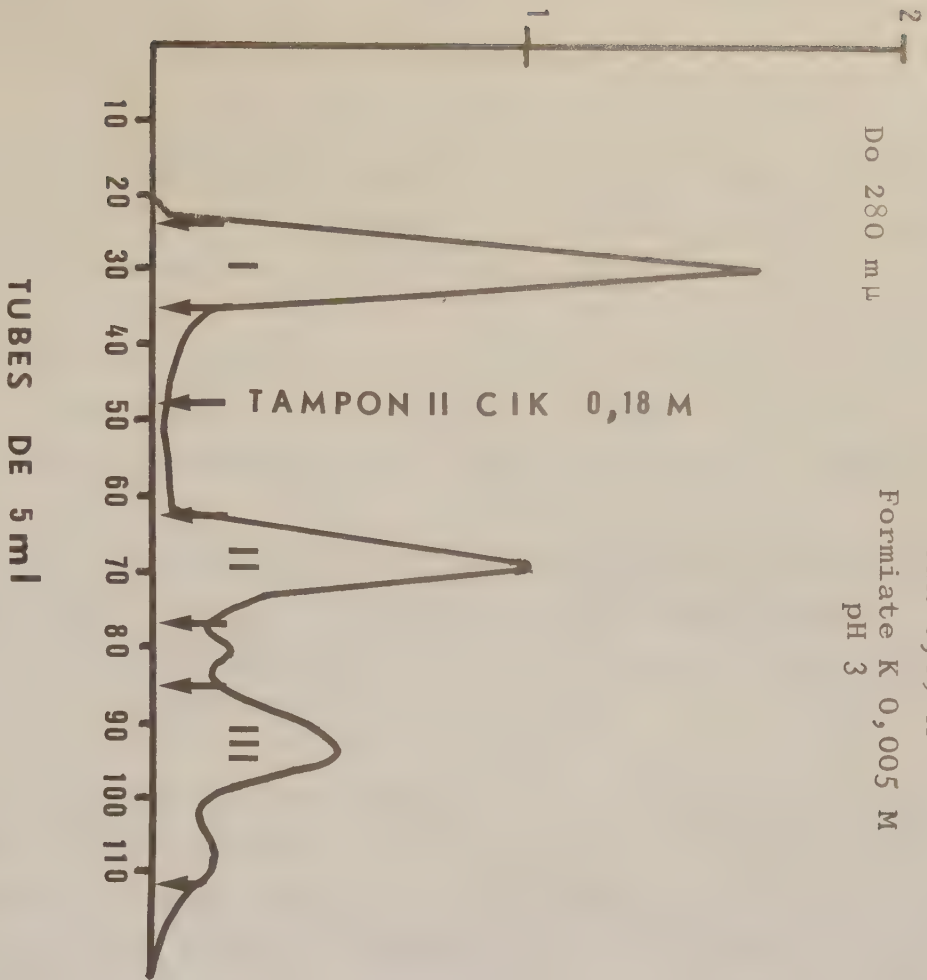
Nous nous sommes attachés à la récupération de ce fragment F'c. Certaines difficultés sont inhérentes à l'obtention de cette protéine à l'état pur à partir de l'urine : en effet, le fragment a une mobilité électrophorétique α_2 et se trouve dans une zone où se rencontrent de nombreuses protéines urinaires, sans rapport cependant avec les immunoglobulines. De plus, la masse moléculaire de ces protéines, sensiblement voisine, rend très difficile sa séparation par gel-filtration. Nous n'avons alors utilisé qu'une seule étape de séparation consistant à éliminer de la préparation les IgG et Fc, de même que les chaînes légères, pour ne récupérer que le seul fragment F'c. Il nous intéressait, en effet, de pouvoir obtenir un immunsérum ne réagissant qu'avec le "déterminant F'c".

Pour la séparation de ce fragment, nous avons préalablement précipité l'ensemble des protéines de cette urine par le sulfate d'ammonium comme précédemment, puis 800 mg du lyophilisat ont été passés sur une colonne de DEAE-cellulose de 50 cm de hauteur.

L'élution est réalisée en gradient discontinu de tampon phosphate de sodium à pH = 6,5. Huit tampons de molarité croissante sont utilisés : 0,005 M, 0,015 M, 0,05 M, 0,075 M, 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M.

Huit fractions successives sont recueillies : la première fraction contient les IgG et chaînes légères, mais non le fragment F'c. Les fractions III et IV contiennent encore des chaînes légères, mais non plus d'IgG ; dans ces fractions, le fragment F'c commence à apparaître : il est prédominant dans les fractions V et VI, et est accompagné par des quantités progressivement croissantes de protéines α_2 , α_1 et albumine dans les dernières fractions.

SE-SEPHADEX C 25
 Tampon urée 8 M
 CIK 0,09 M
 Formiate K 0,005 M
 pH 3



CROQUIS V :
 Séparation sur SE Sephadex C 25 des chaînes légères Kappa et lambda de protéinurie de tubulopathie (voir texte).

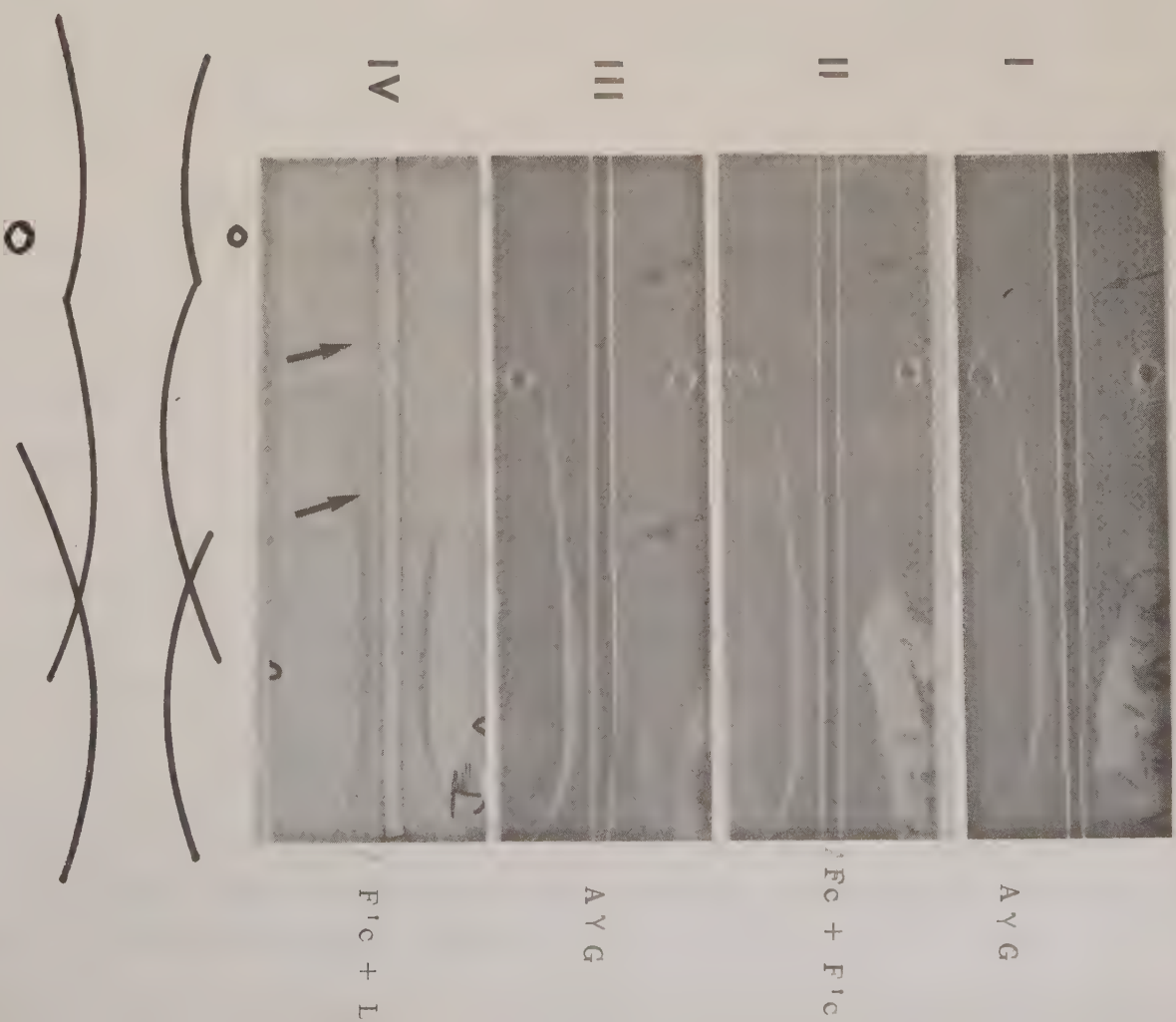


PHOTO XII :
 I, II : IE de F'c séparé. III : IE de fraction contenant encore des CH.L.
 IV : IE vis-à-vis de fragments de γG par AF'c + L (voir texte).

La photo XII indique la présence dans les fractions V, VI, VII et VIII du seul fragment F'c quand celles-ci sont testées vis-à-vis d'immunsérums anti-IgG et anti-Fc+F'c.

La fraction IV, en revanche, contient encore des chaînes légères : ceci est matérialisé dans la photo XII par le fait que le F'c n'a pas de communauté avec l'arc en position cathodique.

Nous avons utilisé la fraction qui contient le fragment F'c, sans IgG et Fc, pour obtenir un immunsérum anti-F'c : après la sixième immunisation, la fraction IV, contenant encore des chaînes légères, a été injectée à l'animal.

L'immuno-électrophorèse de la photo XII, qui a été effectuée contre des fragments d'IgG constitués de Fab, Fc et F'c, montre une identité antigénique entre les fragments Fc et F'c. Cet immunsérum révèle également le fragment Fab : le lapin a reçu, en effet, une certaine quantité de chaînes légères ; il apparaît bien ainsi qu'il soit possible d'obtenir un immunsérum dirigé exclusivement contre le fragment F'c. Deux types d'immunsérum peuvent être obtenus vis-à-vis des fragments Fc et F'c : un AS uniquement anti-Fc ou bien un AS anti-Fc + F'c.

Lorsque l'AS est anti-F'c, il est toujours anti-Fc, mais lorsqu'il a été produit à partir de fragment Fc, ce dernier éperonne sur le F'c. Dans notre expérience, il y a communauté entre Fc et F'c. On peut concevoir ainsi que Fc et F'c partagent deux types de déterminants : I et II que possède le Fc, et I possédé seulement par F'c.

Ce fragment F'c est identique à celui obtenu après digestion papaïnique des IgG sériques. Il contient (169) 210 AA : ce peptide est, en fait, un dimère formé de monomères de 105 AA, associés par des liaisons non-covalentes.

Il a un PM de 21 000 et contient deux molécules d'histidine.

Les IgG, traitées par la pepsine, libèrent un fragment : le pep.F'c. Ce dernier qui possède 232 AA, a un PM de 26 000 et

correspondrait aux 116 AA C-terminaux de la chaîne lourde gamma. Il contient six histidines et pourrait, après action de la papaïne, se transformer en F'c de même mobilité électrophorétique que le F'c papaïne. Il est intéressant de remarquer que le Gm(1) ainsi que le peptide "non a " ne sont pas présents sur le F'c, alors qu'ils le sont sur le p F'c (170).

On s'accorde, actuellement, à penser que ce fragment F'c est dérivé d'un hypercatabolisme des IgG (178), dû à l'hôte, mais on ne connaît pas le ou les sites exacts de cette protéolyse.

- ETUDE QUANTITATIVE -

Comme nous l'avons vu précédemment, les chaînes légères d'Ig, qui apparaissent de façon pratiquement constante dans les urines de sujets atteints de tubulopathies, appartiennent au "pool" de protéines de faible PM : α_2 , β et γ qui, très incomplètement réabsorbées par le tubule, se retrouvent alors, dans les urines en quantités très appréciables.

Nous avons pensé que le dosage de ces chaînes légères pouvait représenter un critère de l'atteinte tubulaire pure ou associée, et la chiffrer ainsi dans la mesure où la concentration en Ig sérique n'était pas perturbée de façon marquée.

D'un autre côté, l'excrétion urinaire des IgG, variant dans le même sens que l'atteinte glomérulaire, nous avons entrepris leur dosage dans l'urine de sujets atteints d'affections rénales très diverses. Ainsi, les deux paramètres étudiés : IgG et chaînes légères, bien qu'étant des éléments constitutifs communs d'une même protéine, sont-ils le témoin du comportement de deux sites différents du rein : glomérules et tubules.

I- Parmi les méthodes utilisées pour doser spécifiquement une protéine dans un mélange donné, la technique d'immuno-diffusion radiaire simple, en deux dimensions, mise au point par MANCINI (92),

est une technique qui, grâce à sa très bonne sensibilité, sa reproductibilité convenable pour une technique immunologique, est très adaptée pour doser des quantités faibles de protéine.

Elle consiste, (cf. Techniques), à incorporer dans un gel d'agar ou d'agarose, un immunsérum monospécifique, puis à percer à l'intérieur de ce gel une série de réservoirs destinés à contenir l'antigène : ce dernier diffuse alors dans le gel et le complexe antigène-anticorps, formé au bout d'un temps variable, se traduit par un cercle dont on détermine la surface.

Trois relations fondamentales ont été étudiées par les auteurs de la technique. En premier lieu, la surface finale du précipité antigène-anticorps est directement proportionnelle à la concentration en antigène lorsqu'on laisse à l'antigène un temps suffisant pour se combiner à l'anticorps : $S = S^0 + K [C, Ag.]$ où S^0 est la surface du réservoir contenant l'antigène ; la surface du précipité n'est donc linéaire qu'après un certain temps de diffusion. Nous avons trouvé que cette diffusion était terminée pour les IgG au bout de 5 jours Elle est achevée plus précocement pour les chaînes légères : 48 heures.

En second lieu, la surface du précipité est inversement proportionnelle à la concentration en anticorps ; en d'autres termes, plus la concentration en anticorps est faible, plus l'antigène peut diffuser librement avant d'être capté complètement par l'anticorps, et plus la surface de précipitation devient grande.

En diluant donc convenablement l'anticorps, on peut doser des quantités faibles de protéines ; certains auteurs ont procédé de cette façon pour doser les IgG et la sidérophiline dans le liquide céphalo-rachidien (27).

En dernier lieu, la taille du précipité à l'intérieur du gel contenant l'anticorps, est reliée à la taille moléculaire de la protéine étudiée : cette constatation a été faite par J.L. FAHEY (39) qui a comparé les tailles des précipités obtenus, respectivement par une protéine de Bence-Jones : 3,4 S ; PM = 40 000, d'une γ globuline (IgG) : PM = 160 000 et d'une IgM : macroglobuline 18S : PM = 900 000.

Si l'on compare donc, pour une même concentration protéique, IgG et chaînes légères, on constate que le rapport des surfaces de diffusion des deux protéines BJ/IgG est environ égal à 2,5.

II-En 1963, STEIN montrait (153) qu'après absorption au moyen d'IgG ou avec un sérum humain normal, un immunsérum anti-protéines de Bence-Jones n'était plus capable de réagir contre des IgG, mais en revanche, conservait ses capacités réactionnelles vis-à-vis des protéines de Bence-Jones seules.

De la même façon, EPSTEIN (36) et coll. montraient que les immunsérums anti-Bence-Jones ont l'avantage sur les immunsérums anti-paraprotéine d'avoir leur spécificité anticorps dirigée entièrement contre la configuration L : en d'autres termes, cet antisérum conserve son activité anti-chaîne légère lorsqu'il a été absorbé par des IgG.

Par utilisation de ces immunsérums ainsi absorbés, TAN (159), par immuno-diffusion de type Ouchterlony, ne détecte pas de chaînes légères dans 47 sérums normaux et 25 urines normales : ce type d'immunsérum peut détecter 20 mg/litre de chaînes légères, selon cette technique.

Nous avons, personnellement, pu obtenir un immunsérum anti-chaînes légères Lambda libre, après absorption d'un immunsérum anti-Lambda fabriqué à partir d'une protéine de Bence-Jones de type Lambda, mais nous n'avons pu obtenir d'anti-Kappa libre. De plus, par la technique de MANCINI, ces immunsérums donnent des cercles de diffusion trop ténus pour être interprétables.

Technique utilisée dans ce travail :

Principe :

Les IgG et les chaînes d'Ig Kappa et Lambda partagent entre-elles des déterminants antigéniques communs qui sont les chaînes légères. Ainsi, un anti-Kappa ou un anti-Lambda réagit également vis-à-vis d'IgG ou de chaînes légères de ces deux types. Pour éviter alors l'interférence qui se produit lorsqu'un antisérum de ce type est mis en présence d'un mélange de ces protéines, nous avons

mis à profit les différences de diffusion qui existent entre IgG et chaînes légères.

La technique choisie est basée sur l'utilisation de trois immunsérums : un anti-Fc d'IgG et un anti-Kappa ou un anti-Lambda. Dans un premier temps, les IgG sont dosées au moyen d'un immunsérum anti-Fc d'IgG. Pour doser ensuite les chaînes légères Kappa ou Lambda libres, on utilise une dilution d'urine dont la concentration en IgG est inférieure à celle mise en évidence soit par l'immunsérum anti-Kappa, soit par l'immunsérum anti-Lambda. Dans ces conditions, seulement, le cercle qui apparaît avec ces immunsérums est dû aux chaînes légères libres ; il sera donc nécessaire d'introduire dans chaque plaque contenant l'immunsérum anti-Kappa ou Lambda, un témoin IgG à concentration telle que l'immunsérum anti-chaîne légère (Kappa ou Lambda) ne provoque plus la formation d'un cercle de précipitation visible.

Matériel et méthodes :

- La technique utilisée est celle décrite au chapitre "Techniques". Sur chaque plaque d'agar sont percées quatre séries horizontales de 5 trous de 3 mm de diamètre dans lesquels sont répartis au moyen d'une micro-seringue de type Hamilton 7,8 microlitres des dilutions d'antigène étalon et de dilution d'urine à étudier.

- Les réactifs. Les tampons et le gel utilisés ont été décrits également au chapitre "Techniques".

- Les immunsérums sont : un anti-Fc d'IgG, un anti-Kappa et un anti-Lambda.

a) L'anti-Fc est fabriqué à partir d'un immunsérum anti-IgG absorbé par des fragments Fab d'IgG. 1 ml d'immunsérum est absorbé par 10 mg de Fab d'IgG lyophilisé : l'absorption est menée pendant une heure à +37°, puis 12 heures à +4° ; le précipité est centrifugé puis éliminé. Après absorption, l'immunsérum contrôlé en immunoelectrophorèse ne réagit plus avec du Fab ni contre des chaînes légères d'IgG ou des protéines de Bence-Jones

Kappa et Lambda ; il réagit toujours avec des IgG normales ou myélomateuses : cet immunosérum est donc spécifique des seules chaînes lourdes d'IgG .

- b) Les immunosérums anti-Kappa et anti-Lambda sont obtenus par immunisation de lapins à partir de chaînes légères Kappa et Lambda excrétées par des malades qui montrent une protéinurie de "type tubulaire". Les chaînes légères sont obtenues comme il a été étudié précédemment, par chromatographie sur résine de DEAE-cellulose suivie de gel-filtration sur Sephadex G-100.

Pour l'immunisation, sont utilisés les derniers pics passant en Sephadex G-100 ne contenant que des chaînes légères. Comme il a été déjà décrit, les injections sont réalisées selon le protocole : une injection dans les coussinets plantaires, suivie d'injections intra-musculaires de 5-10 mg/ml de protéine deux fois par semaine. Les immunosérums sont contrôlés par immuno-électrophorèse vis-à-vis de sérum humain normal, d'IgG, de fragments, et de chaînes légères. Ces immunosérums sont également anti-Kappa et Lambda. Pour les rendre monospécifiques Kappa ou Lambda, ils sont absorbés de la façon suivante :

- Exemple : Immunosérum : 10 ml.
- Chaîne légère (B.J. Kappa) obtenue sur DEAE-cellulose 50 mg.
 - Sérum agammaglobulinémique : 1 ml.
 - 1 heure +37° ; 12 heures +4°. Centrifugation puis contrôle en immuno-électrophorèse.

Cet immunosérum devient donc exclusivement anti-Lambda. Le sérum agammaglobulinémique est ajouté afin d'absorber les anticorps éventuellement présents dirigés contre des protéines n'appartenant pas aux immunoglobulines.

Nous avons également utilisé, pour l'absorption, les protéines urinaires contenues dans les fractions éluées à molarité élevée d'urine de tubulopathie. Chaque type de ces immunosérums réagit également vis-à-vis des chaînes légères "polyclonales" ou des chaînes légères "monoclonales", c'est-à-dire des protéines de Bence-Jones.

Le même type d'absorption est réalisé avec des protéines de Bence-Jones Lambda, afin d'obtenir un immunosérum anti-Kappa (photo XIII).

. Les protéines étalons :

Elles sont constituées par des IgG de sérum normal et des chaînes légères monoclonales de type Kappa ou Lambda.

a) Les IgG :

Elles sont obtenues à partir de sérum humain normal par chromatographie sur DEAE-cellulose (cf. Techniques). La photo XIII montre qu'elles ne sont contaminées par aucune autre protéine après contrôle immuno-électrophorétique au moyen d'un immunosérum anti-humain total : le contrôle est réalisé à 20 mg protéine/ml. Elles réagissent fortement également vis-à-vis d'un immunosérum anti-IgG. Après dialyse, ces protéines sont lyophilisées ;

b) Les chaînes légères Kappa et Lambda :

Elles sont constituées par des chaînes légères monoclonales (protéines de Bence-Jones). Après précipitation par le sulfate d'ammonium (cf. Techniques), les protéines sont chromatographiées sur résine échangeuse d'ions DEAE-cellulose, afin d'éliminer les protéines urinaires associées, puis, si nécessaire, filtrées sur Sephadex G-100 pour séparer les IgG. Il est généralement plus aisé de séparer sur DEAE-cellulose les chaînes légères dont la mobilité est franchement cathodique, car dans ce cas, le risque de contamination par des globulines α_2 urinaires est moindre. D'autre part, la contamination en IgG est toujours faible : pour les protéines de Bence-Jones que nous avons choisies, le pourcentage d'IgG par rapport à la protéinurie était inférieur à 1%. Enfin, la majorité de ces protéines se trouve sous forme de dimères (critère de filtration sur Sephadex G-100). La figure XIII montre les qualités de pureté de ces protéines, vis-à-vis des immunosérums anti-humain total, anti-Fc d'IgG ou anti-chaîne légère.

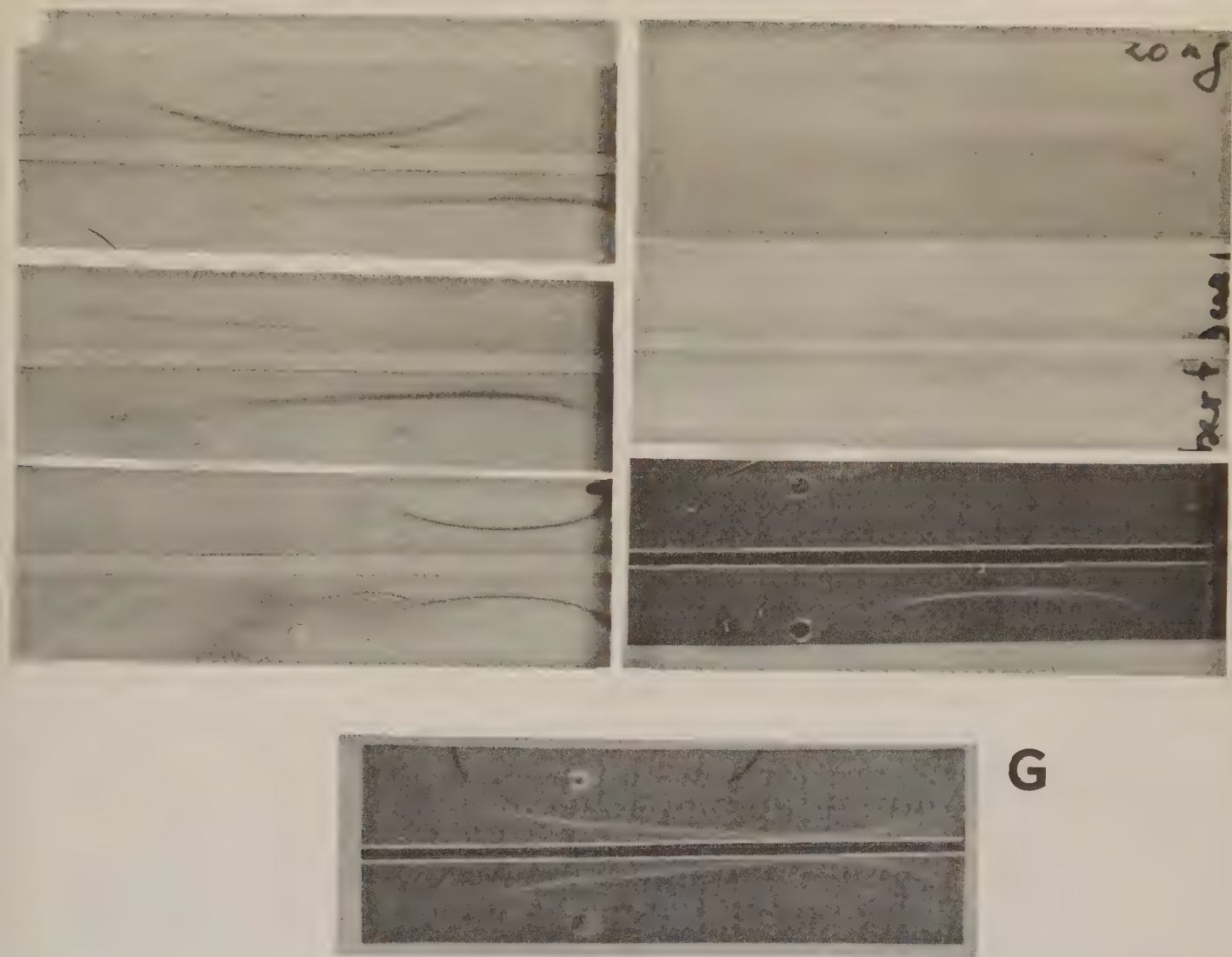


PHOTO XIII : Immunsérums et protéines utilisées dans le dosage des Ig et chaînes légères d'Ig urinaires.

A : Immunsérum anti-Kappa (B.J.-Kappa). B : Immunsérum anti-lambda (B.J.-Lambda). C : IgG isolées (20 mg/ml) vis à vis d'AST. D : Idem vis à vis d'immunsérum anti-IgG. E: B.J.-Kappa vis à vis d'AST. F : B.J.-Kappa vis à vis d'anti-Fc d'IgG. G : B.J.-Lambda vis à vis d'anti-B.J.-Lambda. En A, B, C, D, F : le témoin est sérum humain normal.

c) Après séparation et lyophilisation, un dosage d'azote est réalisé sur chaque échantillon de protéine : IgG, chaînes légères Kappa et Lambda.

Toute quantité pesée de protéine est rectifiée en fonction de sa teneur réelle en azote. En effet, le degré d'hydratation des lyophilisats n'étant pas identique, il est nécessaire d'apporter un facteur de correction : chaque pesée est rectifiée en fonction du pourcentage d'azote des protéines : 16%.

Exemple : Dosage d'une chaîne légère de type Kappa :

Le dosage est réalisé selon la technique décrite au chapitre "Techniques analytiques ".

Calcul : n = 15 ml : volume de ClH nécessaire pour neutraliser l'ammoniaque déplacé.

f = 0,02 N : titre de ClH utilisé.

14,008 = équivalent d'azote.

P = 32,9 mg : prise d'essai de l'échantillon de protéine, le pourcentage d'azote dans l'échantillon est :

$$\frac{14 \times 0,02 \times 15 \times 100}{32,9} = 12,80$$

Le dosage d'azote pratiqué sur les chaînes légère Lambda donne : % azote = 12,30.

Sur l'échantillon d'IgG utilisé : 10,36%.

chaînes légères λ N = 12,30%	chaînes légères κ N = 12,80%	IgG normales N = 10,36%
25 x $\frac{12,30}{16}$ = 19,25	25 x $\frac{12,80}{16}$ = 20	100 x $\frac{10,36}{16}$ = 64,70
2,5 x " = 9,62	12,5 x " = 10	60 x " = 38,80
6,25x " = 4,81	6,25x " = 5	30 x " = 19,40
3,12x " = 2,40	3,12x " = 5	24 x " = 15,50
		12 x " = 7,75
		6 x " = 3,90

Correspondance entre quantité pesée et quantité réelle déduite du dosage d'azote pour deux chaînes légères κ et λ et pour des IgG sériques normales.

I/ Dosage des IgG d'urines de sujets normaux :

Le dosage des IgG dans l'urine de sujets normaux est réalisé directement sur l'urine n'ayant subi aucune concentration. Les échantillons sont conservés à -30° et décongelés seulement au moment de l'emploi. Les échantillons proviennent de 34 sujets théoriquement normaux, dont 29 femmes et 5 hommes.

La concentration optimum de l'immunsérum anti-Fc d'IgG à utiliser dans chaque plaque est établie au préalable en recherchant la dilution d'immunsérum qui permet d'obtenir des cercles de précipitation visible pour les cinq concentrations d'étalonnage : 64,70 ; 38,80 ; 15,50 ; 7,75 ; 3,90 mg/litre.

Dans nos conditions d'expérience, la dilution d'immunsérum convenable finale à l'intérieur de la plaque est de 1/240 : elle permet de mettre en évidence une concentration minimum d'IgG de 3,90 mg/ml 7,8 µl de chaque échantillon d'urine est introduit dans un réservoir. Après cinq jours de diffusion, les plaques sont colorées puis mesurées. Sur un papier millimétré, les surfaces de précipitation sont inscrites en abscisse ; en ordonnée, les concentrations en mg/litre : l'origine de la droite : S° correspond à la surface du réservoir de l'échantillon.

Dans le tableau suivant, sont consignées les valeurs obtenues chez les 34 sujets étudiés.

Concentration mg/litre	Urines jour	%	Urines nuit	%
3,90 ≤	23	68	27	79,5
3,90 < conc > 10	8	23	4	11,5
conc > 10	3	9	3	9
	34	100	34	100

Concentration en IgG en mg/litre de 34 sujets normaux dont 29 femmes et 5 hommes. Dosage pratiqué sur des urines non concentrées.

Discussion :

Le dosage immunochimique des IgG et, dans certains cas, des chaînes et des fragments d'Ig, dans les urines normales, a été entrepris par trois auteurs : VAUGHAN (173), POORTMANS (116a), et BERGGARD (10). POORTMANS révèle un taux d'IgG par 24 heures de 2,450 mg avec un SD de 0,045, et des valeurs limites (1,950 - 3,000) chez 10 sujets mâles en bonne santé : ce dosage étant réalisé au moyen de la technique d'immuno-diffusion radiaire, après concentration de l'urine 1 000 à 1 500 fois.

BERGGARD a pratiqué le dosage des immunoglobulines chez 12 sujets normaux : après concentration, les urines sont filtrées sur Sephadex G-100 ; après repérage des différentes fractions par immuno-diffusion double, chaque fraction d'immunoglobuline est dosée, soit au moyen d'immunsérums spécifiques par diffusion radiaire, soit pour les chaînes légères au moyen d'une technique turbidimétrique. VAUGHAN a réalisé ce dosage par la micro-technique d'LOUDIN sur des urines concentrées environ 200 fois. Comme ROWE et HANSON, VAUGHAN a constaté que les immunoglobulines ne sont pas détruites dans l'urine par des enzymes protéolytiques : après avoir ajouté à un pool d'urines normales des IgG marquées à l'iode, trois aliquotes sont concentrées : deux à 37° et l'une à +4°. Les échantillons sont ensuite étudiés par immuno-diffusion, au moyen d'immunsérums anti-IgG et anti-gamma, en ajoutant comme contrôle des chaînes légères non marquées.

Par radio-immuno-diffusion, on constate qu'il n'apparaît aucune radio-activité dans les chaînes légères, ni dans l'arc de précipitation témoin du fragment Fc ou F'c. Seul l'arc IgG est radio-actif. Cependant, les chiffres obtenus par VAUGHAN sont, pour les IgG et les fragments lourds d'Ig, très différents de ceux obtenus par BERGGARD : il est possible, comme le remarque BERGGARD, que ces discordances soient dûes au fait que, ces dosages étant pratiqués sur un matériel non fractionné, l'interprétation des bandes de précipitation peut être délicate.

	IgG	$\kappa + \lambda$	Fc
VAUGHAN et coll.	0,72 ⁽¹⁾	3,4 (1,2-7,2)	0,72
BERGGARD et coll.	3,2 (1,2-6,5)	3,3	0,2 (0,1-0,4)
POORTMANS	2,450 $\pm$ 0,045 ⁽²⁾ (1,950-3,000)		

Concentration en mg/litre d'IgG de chaînes légères et de fragment F'c dans les urines normales.

(1) Chiffre moyen calculé d'après les pourcentages mentionnés par VAUGHAN.

(2) la moyenne est $\pm$ 16

Pour VAUGHAN, il y aurait en moyenne une quantité égale de fragment Fc-like et d'IgG 7S dans les urines normales, chacune de ces protéines représentant 15% de la somme totale : IgG + chaînes légères + fragment Fc.

Ainsi, les chaînes légères représentant 70% des immunoglobulines (non compris les IgA) seraient-elles les constituants prédominants de ces protéines dans l'urine. Cependant, il nous semble que les résultats obtenus par VAUGHAN, pour les IgG et le fragment Fc ou F'c d'IgG, sont discutables : la quantité d'IgG est certainement supérieure à celle qu'il mentionne, car nous n'avons jamais constaté sur les urines normales concentrées, étudiées par immuno-électrophorèse, qu'il existe une proportion égale de fragment et d'IgG entières. D'autre part, l'utilisation d'urines concentrées nécessite l'emploi d'un facteur de correction qui pourrait retentir sur le résultat final. Pour notre part, nous avons personnellement travaillé sur des urines non concentrées et, dans ce cas, la sensibilité de la technique est insuffisante pour mettre en évidence des quantités faibles de protéine : notre but n'étant pas de doser les Ig d'urines

normales, mais les Ig d'urines pathologiques.

II/ Dosage des IgG et des chaînes légères d'immunoglobulines dans les urines de sujets atteints d'affections rénales diverses :

a) Mise au point de la méthode :

L'urine choisie montre, en électrophorèse et immuno-électrophorèse, des tracés de "protéinurie tubulaire" (voir photo X).

On peut estimer, très approximativement, que la proportion d'IgG complètes est nettement inférieure à 10% de la protéinurie totale qui est égale à 0,80 g/litre, alors que le pourcentage de chaînes légères est supérieur à 10%. Ainsi, on peut admettre que la concentration en IgG est inférieure à 80 mg/litre.

- Dosage des IgG :

Pour réaliser ce dosage et afin de se trouver dans la zone convenable d'étalonnage, l'urine est diluée 1/2 dans le tampon utilisé pour la fabrication du gel. La concentration calculée, tenant compte de la dilution réalisée, est de 16 mg/litre. Nous n'avons pas effectué des études de reproductibilité de la méthode pour ce qui concerne les IgG. Sur des échantillons à faible teneur en IgG, comme le LCR et, dans des conditions sensiblement comparables, B.DELPECH (27) pratiquant le dosage des IgG de LCR obtient une précision de 13,22% : nous n'avons pas obtenu une meilleure précision, lors des dosages en double d'un échantillon.

- Dosage des chaînes légères :

Si l'on estime la concentration en chaînes légères à environ 30% de la protéinurie totale, la quantité de chaînes légères dans l'urine considérée est d'environ 240 mg. Si l'on considère, d'autre part, que le rapport Kappa/Lambda : $2/3$ / $1/3$ est respecté dans ce type d'urine, la quantité de chaînes Kappa et de chaînes Lambda

devrait être respectivement : 160 mg et 90 mg. Se basant sur ces chiffres, les dilutions de l'urine à étudier seront respectivement de 1/10 pour les Kappa et 1/5 pour les Lambda, afin de se placer dans la zone convenable d'étalonnage.

Résultats :

1/ Deux plaques ont été réalisées pour le dosage des chaînes légères Kappa. Dans chacune, deux séries de témoins ont été introduites :

1ère rangée : Ch. l. κ : 20 10 5 2,5 mg/litre

2ème rangée : IgG : 64,70 38,80 19,40 15,50 7,75 3,90 mg/litre

3ème et

4ème rangées: 10 échantillons d'une dilution au 1/10 de l'urine de "protéinurie tubulaire".

La dilution de l'immunsérum à l'intérieur de la plaque est 1/180.

Après diffusion et coloration, les surfaces de précipitation sont mesurées. Celles-ci décroissent linéairement, par rapport à la concentration de protéine, comme attendu dans cette méthode.

Cependant, le rapport des surfaces (S) de diffusion des deux types de protéines sont très différents. Ainsi, le rapport :

$$\frac{\text{Kappa}}{\text{IgG}} = \frac{(S) \ 20 \text{ mg}}{(S) \ 64,70 \text{ mg}} \quad \# \quad 1,30.$$

De plus, le cercle de précipitation des IgG, pour la valeur : [15,50] n'est plus mesurable, de même que pour les concentrations inférieures.

Sur les 20 déterminations réalisées, la valeur moyenne obtenue est de 71,80 mg/litre avec un écart-type de 5,20. La taille de l'échantillon étant inférieure à 30, le nombre d'écart-type à reporter de part et d'autre de la moyenne est égal à 2,09 pour inclure 95% de la population, soit :

$$\text{chaînes légères Kappa} = 71,80 \text{ mg/litre} \pm 10,86.$$

La précision est donc de 15,10%.

2/Deux plaques ont été réalisées pour le dosage des chaînes légères Lambda :

1ère rangée : Ch. 1.λ : 30,80 15,40 7,70 3,85 mg/litre
2ème rangée : IgG : 64,70 38,80 19,40 15,50 7,75 3,90 mg/litre.

La valeur moyenne obtenue est de 54,50 mg/litre ± 6,27.

La précision est donc de 11,50%.

Sur ces plaques, l'anneau de précipitation des IgG est très faible et non mesurable pour la valeur [15,50].

	mg/litre	en pourcentage de protéines totales
Protéines	800	
IgG	16	2
Chaînes légères Kappa	71,80	9
Chaînes légères Lambda	54,50	6,8
Kappa + Lambda	126,30	15,8
Kappa + Lambda + IgG	142,30	17,8

Concentration des IgG et chaînes légères dans une
" protéinurie tubulaire ".

Le rapport Kappa/Lambda est égal à 1,31 et donc légèrement inférieur à celui trouvé dans le sérum humain normal : 1,78 (39) ; mais, dans ce dernier cas, il s'agit des chaînes légères liées aux immunoglobulines normales : IgG, IgA et IgM.

b) Utilisation de la méthode pour le dosage des IgG et des chaînes légères Kappa dans des urines provenant d'affections rénales diverses :

- Nous avons entrepris, par cette technique, le dosage des IgG et des chaînes légères Kappa dans différentes urines. Ces dernières ont été classées sous quatre rubriques différentes, selon qu'elles appartenaient aux tracés électrophorétiques et immuno-électrophorétiques de type sélectif, non sélectif, tubulaire et physiologique, sans tenir compte des étiologies proprement dites. Les critères de sélection utilisés sont avant tout semi-quantitatifs et basés sur la présence ou non d'arcs tels que les IgG, α_2 M, etc... (127), ainsi que de l'importance des zones α_2 et γ en électrophorèse sur agar et amidon.

Ont été regroupées sous le terme de "protéinurie tubulaire" les urines dont la concentration protéique est égale ou supérieure à 0,1 g/‰ et qui montrent les aspects caractéristiques de ces types de tracés.

Au-dessous de ces valeurs, les protéinuries sont considérées comme "physiologiques", sauf pour ce qui concerne les protéinuries faibles comportant des protéines "lourdes" : tracés de protéinurie sélective ou non sélective.

Après détermination de la concentration protéique des urines, celles-ci sont conservées à -30° jusqu'au moment de leur utilisation. Afin de se placer dans les zones normales d'étalonnage, la dilution éventuelle de l'urine à analyser pour ces IgG et chaînes légères Kappa est établie en se basant sur les résultats obtenus à partir de l'étude électrophorétique ou immuno-électrophorétique.

Exemple :

PNS*	# IgG 10%	Dilution	Concentration théorique en IgG
0,9 g °/‰	0,09 g °/‰	1/2	0,045 g °/‰

* Protéinurie non sélective.

Le dosage des IgG donne : 54 mg/litre.

En tenant compte de cette valeur, l'urine sera alors diluée au 1/3 : $\frac{54}{3} = 18$ mg IgG, et au 1/5 : $\frac{54}{5} = 10,8$ mg IgG pour le dosage des chaînes légères Kappa. On constate ainsi qu'il n'y aura pas d'interférence entre IgG et chaînes légères Kappa, puisque à ces concentrations, les IgG ne peuvent être révélées sur la plaque contenant l'immunsérum anti-Kappa.

Résultats :

Nous avons effectué le dosage des IgG sur 97 urines, alors que 83 ont été étudiées pour les chaînes légères Kappa. Les valeurs obtenues sont exprimées en pourcentage de la protéinurie totale.

1°) Les protéinuries : non sélectives et mi-sélectives : (Tableau I).

a) Les IgG :

Le chiffre moyen est de 7,31%. Il faut remarquer que ce chiffre, apparemment légèrement inférieur à celui trouvé dans les déterminations électrophorétiques, est dû, d'une part au fait que seules les IgG sont dosées par la technique, et non les IgA, les chaînes légères et les autres protéines de cette zone déterminées par l'électrophorèse, d'autre part au fait qu'ont été classés dans cette rubrique les tracés de "protéinurie moyennement sélective" qui ne pouvaient entrer dans la rubrique "protéinuries sélectives".

b) Les chaînes légères Kappa :

Le pourcentage moyen sur 33 échantillons est de 6,19. Dans la plus grande partie des cas, ces chaînes légères libres sont visibles en immuno-électrophorèse au moyen des immunsérums anti-IgG polyspécifiques sur les urines concentrées à 30 ‰.

2°) Protéinurie sélective : (Tableau I).

Le pourcentage d'IgG totales dans ces protéinuries est faible : en moyenne 1,97%, ainsi que celui des chaînes légères Kappa : 1,25%.

3°) Protéinurie tubulaire : (Tableau I)

Pour ces types d'échantillons, les valeurs d'IgG sont intermédiaires entre celles de protéinurie non sélective et celles de protéinurie tubulaire : 3,42%. En revanche, les valeurs en chaînes légères Kappa sont très élevées : en moyenne 9,24%.

- Le dosage des IgG a été entrepris dans l'urine de 20 sujets atteints, soit de myélome multiple des os, soit de maladie de Waldenström dont cinq myélomes IgG kappa avec quatre s'accompagnant de protéine de Bence-Jones urinaire, trois IgG Lambda avec Bence-Jones urinaire, deux IgA Kappa avec Bence-Jones urinaire, trois IgA à type de chaîne légère inconnu, une IgA Lambda avec Bence-Jones urinaire, trois IgM Kappa avec Bence-Jones urinaire, une IgM Lambda avec Bence-Jones urinaire et deux urines de myélome à chaînes légère respectivement Kappa et Lambda.

Deux urines ont une protéinurie inférieure à 0,1 g ‰ : leur concentration en IgG est inférieure à 3,90 mg/litre. 9 urines ont une protéinurie supérieure à 0,1 ‰ avec une concentration d'IgG inférieure à 3,90 mg par litre ; 9 urines ont une teneur en IgG supérieure à 3,90 mg/litre avec des pourcentages par rapport à la protéinurie totale s'échelonnant jusqu'à 3,5% quelle que soit la classe de la paraprotéine intéressée.

Nous verrons un peu plus loin qu'il peut s'agit d'IgG entières, monoclonales ou non, mais aussi, bien qu'en faible proportion, de fragments d'IgG, soit Fc soit F'c, puisque l'immunsérum ne peut faire la discrimination entre IgG entières et fragments lourds d'immunoglobulines G.

- Nous avons pratiqué le dosage des IgG et des chaînes légères Kappa dans les urines de 17 marathoniens avant et après l'effort. Avant l'effort, la concentration en IgG est toujours inférieure à 3,90 mg/litre, sauf dans 2 échantillons (18,90 et 8,40).

La concentration en chaînes légères Kappa est supérieure à 2,50 mg/litre dans 10 échantillons avec des valeurs comprises entre 2,5 mg et 20 mg/litre.

Après l'effort, nous avons pu examiner les IgG de 6 échantillons. Sur ces derniers, la concentration en IgG est toujours supérieure à 30 mg/litre. La concentration en chaînes légères Kappa est également augmentée, mais dans une proportion moindre que celle des IgG. Dans les 6 cas le rapport Kappa/IgG est toujours inférieur à 1, à l'exception d'un cas.

	1	2	3	4	5	6
IgG	54,60	59,50	43,40	32,55	32,55	76,30
chaînes légères κ	45	40	30	44	13	74
Kappa/IgG	0,83	0,67	0,69	1,35	0,40	0,97

IgG et chaînes légères Kappa après un marathon chez
6 sujets mâles.

Ce tableau indique qu'il existe une augmentation de la perméabilité glomérulaire après effort puisque la concentration en IgG se trouve élevée d'au moins 10 fois par rapport à la concentration en IgG trouvée au repos.

Cependant, l'élévation de la concentration en chaînes légères Kappa est moindre que celle des IgG : ainsi, le rapport Kappa/IgG est-il toujours pratiquement inférieur à 1. Le fait que ce rapport soit toujours inférieur à 1 indique que les urines de ce type ne peuvent être classées dans le groupe des "protéinuries tubulaires". Ces résultats sont en accord avec ceux de Mc KAY (91) et surtout de POORTMANS (116b) qui montrent que le pic à l'ultracentrifugation des 7S est beaucoup plus important dans l'urine d'exercice que le pic correspondant à l'urine normale.

III/ Les immunoglobulines dans les urines des greffes rénales :

Quelques travaux ont été réalisés sur les urines de sujets ayant subi une greffe rénale (122). Des lésions glomérulaires ou tubulaires peuvent suivre la transplantation rénale et provoquer une protéinurie. Cette protéinurie peut être due, soit à une augmentation de la perméabilité glomérulaire, soit à une diminution de la réabsorption tubulaire.

Immédiatement après la greffe, survient une protéinurie provoquée par les lésions dues à une ischémie rénale : les tracés électrophorétiques obtenus sont semblables à ceux trouvés dans les cas de néphrite tubulo-interstitielle aiguë à la reprise de diurèse, c'est-à-dire des tracés de type tubulaire.

La protéinurie disparaît en cas de succès de la greffe ; si des complications surviennent, la protéinurie réapparaît et, dans tous les cas, le type de protéinurie dépend de la complication et peut être soit sélectif de lésions glomérulaires, soit peu ou non sélectif lors des crises de rejet, impliquant des lésions plus importantes.

L'étude quantitative de la sélectivité rénale aux protéines plasmatiques a été réalisée par BRAUN, au moyen de la technique de JOACHIM (80), en dosant sur les urines concentrées et les sérums correspondants : la transferrine, les IgG, IgA et IgM.

Dans cette technique, les clearances rénales des protéines étudiées sont exprimées en pourcentage de la clearance de la transferrine et en fonction de leur PM : (sur un graphique de type log-log) ; on obtient ainsi une droite dont la pente θ exprime le degré de sélectivité rénale.

Dans les cas de réussite de la greffe, la sélectivité de la protéinurie est normale : θ est aux alentours de 60° , alors que dans les périodes de rejet de la greffe, la sélectivité est en moyenne toujours très faible : l'angle θ est en moyenne de 27° ; cependant, après traitement thérapeutique du rejet, la sélectivité s'améliore.

Les immunoglobulines, essentiellement les chaînes légères, ont été étudiées d'une part par MANUEL (94) qualitativement par immuno-électrophorèse et électrophorèse en gel d'amidon sur les urines concentrées, et par EPSTEIN (37) ; ce dernier dose les chaînes légères par une technique qui utilise un immunsérum ne reconnaissant que les chaînes légères d'Ig. Pour EPSTEIN, l'augmentation des chaînes légères dans l'urine serait constatée après un échec de la greffe ; un retour du taux des chaînes légères vers la normale serait de bon pronostic, alors que les sujets conservant un taux de chaînes légères élevé auraient une aptitude significative au rejet de la greffe. Pour MANUEL, on observe également dans les premiers temps une protéinurie de type tubulaire avec chaînes légères ; cependant, et contrairement aux conclusions d'EPSTEIN, la quantité de chaînes légères resterait élevée dans le temps, même chez les sujets greffés dont la greffe a réussi et sans menace de rejet.

- Nous avons pu doser, selon notre technique, les IgG et les chaînes légères de 6 transplantés rénaux : cependant, nous ne possédons pas, pour chacun des prélèvements, l'état clinique du malade.

Du tableau VI on peut tirer quelques conclusions. Pour le sujet n°1, le rapport Kappa/IgG indique une nette tendance vers la "protéinurie tubulaire", puis le rapport s'abaisse car la concentration en IgG s'élève.

Les sujets 2, 5 et 6 ont également un rapport élevé, témoin probable de protéinurie tubulaire. Enfin, les rapports des sujets 3 et 4 sont plus faibles avec excrétion des IgG importante les classant dans le type de protéinurie non sélective. Pour aucun des sujets examinés, nous n'avons pu pratiquer d'électrophorèse ou d'immuno-électrophorèse, sauf pour le sujet n°1 dont les tracés sont effectivement à classer dans ceux de protéinurie tubulaire. Il est à remarquer également que les concentrations en chaînes légères restent plus élevées que dans les protéinuries physiologiques même lorsque la protéinurie revient vers la normale.

Discussion :

Nous avons essayé de déterminer s'il existe une relation entre les tracés électrophorétiques et immuno-électrophorétiques qui

peuvent être classés, comme nous l'avons déjà vu, en trois groupes selon l'importance de l'excrétion des protéines de PM élevé, et le dosage des IgG et des chaînes légères Kappa. Il faut remarquer, cependant, que la répartition des différents échantillons en trois groupes est parfois délicate : certaines de ces urines, classées dans le groupe de "protéinurie non sélective", alors que les tracés comportent également des protéines : α_2 ou même chaînes légères, pourraient à la limite être introduites dans le groupe de "protéinurie tubulaire". Ainsi, y-a-t-il un certain chevauchement entre les différents groupes étudiés. Cependant, certains points peuvent être dégagés de cette étude.

1- Si l'on compare les chiffres obtenus pour les IgG, les moyennes obtenues sont différentes dans les trois groupes : élevées pour le groupe non sélectif, basses pour le groupe sélectif, intermédiaires pour le groupe tubulaire (tableau II).

2- De même, si l'on compare les chiffres des chaînes légères Kappa, celles-ci sont élevées dans le groupe tubulaire, basses dans le groupe sélectif, intermédiaires dans le groupe non sélectif.

3- La somme : IgG + chaînes légères Kappa est toujours supérieure à 10% de la protéinurie totale dans les groupes : non sélectif et tubulaire, et inférieure à 3,5% dans le groupe sélectif.

4- Pour chaque couple étudié (Kappa - IgG), la différence des moyennes entre chaque groupe étudié (S-T ; S-NS ; NS - T) (Tableau III), est significative.

5- Il existe un certain parallélisme entre l'excrétion des chaînes légères et celle des IgG dans les groupes : non sélectif et sélectif. Cependant, l'excrétion des chaînes légères est toujours plus faible que celle des IgG. En revanche, l'excrétion des chaînes légères est très nettement supérieure à celle des IgG dans le groupe tubulaire. Dans un cas, nous avons obtenu une excrétion d'IgG pratiquement nulle par rapport à celle des chaînes légères, sans qu'il y ait pour autant suspicion de myélome.

6- Dans chaque groupe, nous avons étudié le rapport :

Chaînes légères Kappa

IgG.

Ce rapport est le plus faible pour le groupe sélectif (Tableaux IV et V); il est légèrement inférieur à 1 pour le groupe non sélectif. Il est très nettement supérieur à 2 dans le groupe tubulaire. Certains chiffres sont intermédiaires de ceux trouvés dans les tracés non sélectifs et les tubulaires : effectivement, ces urines montrent des tracés électrophorétiques et immuno-électrophorétiques qui, en dehors des immunoglobulines, comportent des protéines α_2 et β spécifiques des tracés tubulaires.

7- Il semble ainsi que l'étude des trois paramètres : pourcentage d'IgG et pourcentage de chaînes légères Kappa, par rapport à la protéinurie totale, rapport d'excrétion Kappa/IgG, puisse donner une indication très valable permettant d'orienter vers un des trois types de protéinurie, et par extension d'évaluer l'importance respective des atteintes glomérulaire et tubulaire.

Il est évident que certains chiffres sont difficiles à interpréter : ainsi, un rapport Kappa/IgG, compris entre 0,5 et 0,9 pourrait faire inclure l'urine étudiée soit dans le groupe sélectif, soit dans le groupe non sélectif : il faut tenir compte donc, également, des valeurs respectives des chaînes légères Kappa et des IgG. De même, certaines valeurs de rapport à l'intérieur des groupes, par exemple dans le groupe non sélectif, sont comprises entre 1 et 2 : dans la plupart de ces cas, comme nous l'avons déjà fait remarquer, les tracés comprennent des protéines de "protéinuries tubulaires".

Il apparaît donc que l'élévation du rapport puisse indiquer une éventuelle participation tubulaire. Cependant, des précautions sont à prendre dans l'interprétation de ces chiffres : ceci concerne en particulier les sérums de cirrhose avec très forte hypergammaglobulinémie et passage dans l'urine des Ig : ces cas, très rares à la vérité, ne s'accompagnent pas du passage dans l'urine de protéines de PM élevé telles que l' α_2 M ; les protéines, comme l'albumine et la sidérophiline, bien que de PM plus faible n'y sont également présentes qu'en faible proportion.

L'étude quantitative de la sélectivité de la membrane glomérulaire a été principalement réalisée par les auteurs anglais

qui ont montré qu'il existe un rapport entre la clearance d'une protéine plasmatique et son PM ou, plus exactement, la forme de la molécule et sa charge électrique. CAMERON (19) a ainsi étudié 134 urines provenant de syndromes néphrotiques en dosant dans le plasma et l'urine les IgG et la sidérophiline. En exprimant la clearance des IgG en fonction de la clearance de la sidérophiline, on obtient un rapport $\left(\frac{UV}{P}\right) \text{ IgG} / \left(\frac{UV}{P}\right) \text{ Sid}$, dans lequel le facteur V peut être ignoré.

Ce rapport exprime alors un index de sélectivité. Ce dernier est d'autant plus élevé que la sélectivité est basse : ainsi, un index supérieur à 0,20 est toujours associé à un mauvais pronostic. Dans le syndrome néphrotique, la sélectivité de la protéinurie est un fait constant.

Un autre mode d'expression a été utilisé par JOACHIM (80), comme nous l'avons vu précédemment.

Des protéines de faible PM (70) présentes en quantité relativement abondante dans les urines d'affections tubulaires comme dans le syndrome de Fanconi, ainsi que des enzymes comme le lysozyme et la ribonucléase de faible PM (71), également présentes dans le même type d'affections, ont été utilisées en tant qu'indicateurs de l'atteinte tubulaire. Dans le syndrome de Fanconi, la clearance de deux protéines de faible PM est très élevée : 15 ml/minute et 25 ml/minute ; alors que la clearance normale de ces deux protéines a été évaluée à 1,9 ml/minute et à 0,024 ml/minute. De même, la ribonucléase et le lysozyme, qui ont un PM inférieur à celui de l'albumine, ont une clearance qui augmente en fonction de l'atteinte tubulaire : la clearance du lysozyme peut s'élever dans ce cas à 20% de la clearance de la créatinine. Ces résultats indiquent que les deux enzymes, de même que les protéines de très faible PM, sont à l'état normal, réabsorbées après avoir franchi la membrane glomérulaire, alors que leur excrétion s'élève nettement lorsqu'il existe une atteinte des cellules tubulaires proximales.

Les chaînes légères d'Ig appartiennent, comme nous l'avons déjà précisé, à cet ensemble de protéines de faible PM que le tubule réabsorbe peu ou pas et qui peuvent donc être prises comme témoin de

l'insuffisance tubulaire. Il apparaît donc que l'étude du rapport Kappa/IgG peut être un témoin intéressant du comportement des glomérules et des tubules.

o

o

o

	IgG		Chaînes légères κ	
NS*	7,31 (2 - 13)	[41]	6,19 (2 - 17)	[33]
S	1,97 (0,1-3,5)	[32]	1,25 (0,2 - 1,5)	[29]
T	3,42 (0,1- 6)	[24]	9,24 (2,9 - 22)	[21]

TABLEAU I -

Pourcentage d'IgG dans 97 urines, et de chaînes légères Kappa dans 83 urines. Les chiffres entre parenthèses représentent les valeurs extrêmes obtenues, les chiffres entre crochets, l'effectif étudié.

* Dans la rubrique [NS] sont également compris les tracés intermédiaires entre sélectifs et non sélectifs.

	Couples Kappa/IgG		
	Sélectif	Non sélectif	Tubulaire
Nombre de couples étudiés	23	31	18
Moyenne Kappa	1,19	6,34	9,22
Moyenne IgG	2,11	7,65	3,83
Moyenne Kappa + IgG	3,30	13,99	13,05
Ecart type Kappa	1,01	3,69	4,72
Ecart type IgG	1,24	4,25	2,21
Coefficient de corrélation	0,80	0,52	0,67

TABLEAU II -

Pourcentage, par rapport à la protéinurie totale, des chaînes légères Kappa et des IgG dans les groupes SELECTIF, NON SELECTIF et TUBULAIRE, étudiés par couples.

	Différence des moyennes chaînes légères Kappa	t	P	Différence des moyennes IgG	t	P
S-T	- 8,02	7,72	< 0,01	- 1,72	3,07	< 0,01
S-NS	- 5,15	6,38	< 0,01	- 5,54	5,94	< 0,01
T-NS	2,87	2,31	< 0,01	- 3,81	3,46	< 0,01

TABLEAU III -

La différence des moyennes des chaînes légères Kappa et des IgG, entre chaque groupe étudié (S-T ; S-NS ; T-NS), est significative.

S = sélectif.

NS = non sélectif.

T = tubulaire.

	Sélectif	Tubulaire	Non sélectif
Moyenne des rapports Kappa/IgG	0,55	2,99	0,90
Variance du rapport	0,07	4,79	0,23
Ecart - type	0,26	2,19	0,48
Effectif	23	18	31

TABLEAU IV -

Moyenne des rapports Kappa/IgG dans les 3 groupes :
SELECTIF, TUBULAIRE et NON SELECTIF.

	Différence des moyennes	t
S-T	- 2,44	5,16
S-NS	- 0,35	3,08
T-NS	2,09	4,99

TABLEAU V -

Comparaison des moyennes des rapports : S-T, S-NS et T-NS.

La différence des moyennes est significative.

	Protéinurie = PR	Kappa / IgG
<u>Sujet N°1</u> -		
- de 0 (6jours après greffe) à 12 jours	Moyenne 0,20 ‰	$1,50 \left\langle \frac{K}{IgG} \right\rangle 2,90$
- de 12 à 24 jours	0,80 - 4,5 ‰	$0,20 \left\langle \frac{K}{IgG} \right\rangle 1$
<u>Sujet N°2</u> -		
- de 0 (13jours après greffe) à 12 jours	PR < 0,20	$2 \left\langle \frac{K}{IgG} \right\rangle 2,90$
<u>Sujet N°3</u> -		
- 8 dosages	$0,50 \left\langle PR \right\rangle 1,50$	$0,40 \left\langle \frac{K}{IgG} \right\rangle 1,10$
<u>Sujet N°4</u> -		
- 6 dosages	$0,45 \left\langle PR \right\rangle 4,5$	$0,40 \left\langle \frac{K}{IgG} \right\rangle 2$
<u>Sujet N°5</u> -		
- 21 dosages	3 PR 0,90 0,90 1,5	1,15 1,75 1,10
<u>Sujet N°6</u> -		
- 24 dosages	18 PR moyenne 0,20 Moyenne 0,45 ‰	$1 \left\langle \frac{K}{IgG} \right\rangle 2$ $1,3 \left\langle \frac{K}{IgG} \right\rangle 4,5$

TABEAU VI -

Protéinurie et rapport Kappa/IgG chez six transplantés rénaux.

B- LES IMMUNOGLOBULINES DE L'URINE DE SUJETS

ATTEINTS DE MALADIES MALIGNES

(MYELOME MULTIPLE DES OS , MALADIE DE WALDENSTROM
ET MALADIE DITE DES "CHAINES LOURDES").

A- LES PROTEINES DE BENCE-JONES :

C'est en 1848 que H. BENCE-JONES (5) signala la présence dans l'urine d'une "albumine" à caractère de thermosolubilité particulier : cette protéinurie, de caractère inhabituel, était principalement rencontrée chez les malades atteints de myélome multiple des os.

Depuis ce temps, des progrès considérables ont été réalisés qui ont permis d'élucider la nature de ces protéines particulières. On les définit maintenant plus volontiers par leurs caractéristiques de structure, et leurs propriétés immunologiques, plutôt que par leur thermosolubilité : sont dénommées protéines de Bence-Jones, les seules protéines qui répondent à ce critère de solubilité à la chaleur. Par identification immunochimique, ces protéines doivent être décrites comme "chaînes Kappa" ou "chaînes Lambda". (103)

Nous ne reviendrons pas sur l'historique, la nature, la biochimie de ces protéines que nous avons étudiées dans les chapitres précédents : nous rappellerons simplement qu'elles représentent les chaînes légères des immunoglobulines, qu'elles existent dans la plupart des cas, sous forme de dimères et qu'elles possèdent une hétérogénéité physique et antigénique très restreinte (25). Elles sont connues par les auteurs anglo-saxons, sous le terme de "M components" composants monoclonaux, c'est-à-dire issus d'une lignée cellulaire de plasmocytes unique, contrairement aux chaînes légères des urines normales, produits des très nombreux clones cellulaires de l'individu normal. A ce critère d'homogénéité est lié, en particulier, le fait

que ces protéines ont une mobilité électrophorétique très précise, d'où cette notion de "bande étroite" qui, valable pour les IgG, IgA ou IgM, paraprotéines monoclonales, l'est également pour les protéines de Bence-Jones.

La présence d'une protéinurie de Bence-Jones dans le myélome et la maladie de Waldenström est fréquente : de 40 à 60% pour la plupart des auteurs et nos propres résultats, alors que la protéinurie est constatée dans environ 80 à 90%. Dans 53% des myélomes, pour LINDSTROM (90), la quantité de chaînes légères excrétées est comprise dans les taux montrés par les sujets non protéinuriques. En fait, comme nous pourrions le constater dans le paragraphe suivant, il est très souvent possible de détecter des quantités faibles de chaînes légères monoclonales par les méthodes immunochimiques, après concentration suffisante de l'urine. Le type immunologique de la paraprotéine sérique n'a pas d'incidence particulière sur l'excrétion de la protéine de Bence-Jones : en d'autres termes, le pourcentage de protéinuries de Bence-Jones est à peu près identique dans les myélomes IgG et IgA. Le type immunologique de la chaîne légère excrétée est identique à celle du composant monoclonal du sérum. Très exceptionnellement, deux chaînes légères de type immunologique différent Kappa et Lambda ont été mises en évidence dans l'urine d'un malade (35). La protéinurie de Bence-Jones est beaucoup moins fréquente au cours de la macroglobulinémie de Waldenström. Lorsqu'elle est présente, elle est le plus souvent de mauvais pronostic, pour toute paraprotéinurie, et ceci quel que soit le type immunologique. L'amélioration apportée par le Melphalan dans le traitement des myélomes à immunoglobulines comportant des chaînes légères Kappa n'a pas été confirmée par les travaux de MESHAKA (96) et coll.

Dans de nombreux cas, il n'est pas possible de démontrer une diminution de la fonction rénale, malgré l'importante excrétion de protéines de Bence-Jones, de même que l'on constate rarement de tracés de type tubulaire complets, bien que fréquemment quelques protéines spécifiques de ces tracés y soient rencontrées.

1°) ETUDE ELECTROPHORETIQUE :

L'étude électrophorétique et immuno-électrophorétique permet de mettre en évidence une très grande hétérogénéité parmi les

chaînes légères qu'elles soient de type Kappa ou de type Lambda. Cette hétérogénéité est surtout manifeste lorsque l'on utilise des gels filtrants du type gel d'amidon ou de polyacrylamide (44). Cependant, elle est déjà remarquable en électrophorèse sur papier ou en immuno-électrophorèse sur gel d'agar. La photo XV montre la mobilité de quelques chaînes légères, ainsi que de maladie de Waldenström. Comme on peut le constater, dans ce type de gel, il n'existe pas de mobilité plus anodique que la mobilité α_2 , alors qu'il n'est pas impossible de rencontrer des chaînes légères monoclonales de mobilité gamma très lente. Dans la plupart des cas, les chaînes légères migrent dans la zone β_2 . En immuno-électrophorèse, en gel d'agar, il peut se produire également des précipitations en double courbure (photo XV), sans déficience antigénique de l'un ou l'autre arc de précipitation.

Il ne s'agit donc pas, vraisemblablement, dans ce cas, de deux chaînes légères monoclonales différant l'une de l'autre, par un ou plusieurs déterminants antigéniques, mais plus sûrement par le fait que les deux protéines supportent des charges électriques inégales ; à cela, s'ajoutent les états de polymérisation différents qui sont manifestes surtout lorsque l'on utilise les gels filtrants type polyacrylamide ou amidon (photo XIV). A l'intérieur de ces gels, les chaînes légères monoclonales affectent les mobilités électrophorétiques les plus variées : certaines de ces protéines peuvent avoir en gel d'amidon une mobilité post-albumine mais à l'inverse, montrer une mobilité très cathodique, migrant parfois en arrière du point de départ, alors même que ces types de gel sont connus pour ne subir que faiblement le courant d'électro-endosmose.

Lorsque l'on sait que ces protéines existent rarement dans un état de polymérisation où $n > 2$, donc avec un PM d'environ 50 000, on conçoit aisément qu'il existe entre chacune d'elles une très importante différence de charges. On peut ainsi constater des phénomènes de micro ou de macro-hétérogénéité (photo XIV D.E.F.), se traduisant par la présence de bandes successives soit largement ou peu séparées l'une de l'autre, bien que l'analyse immunochimique ne puisse révéler qu'un type de constituant présent sous la forme d'un seul arc.

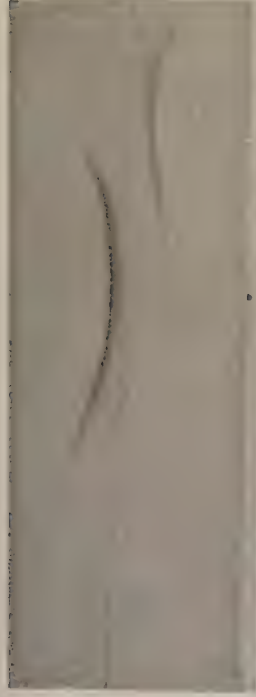
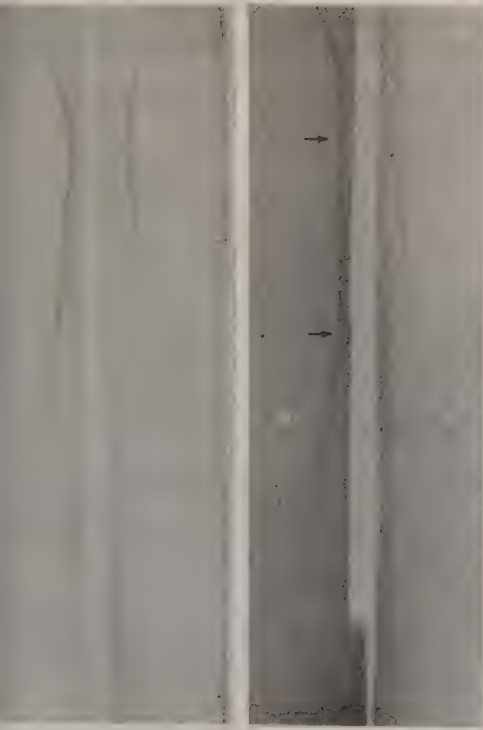


PHOTO XIV :

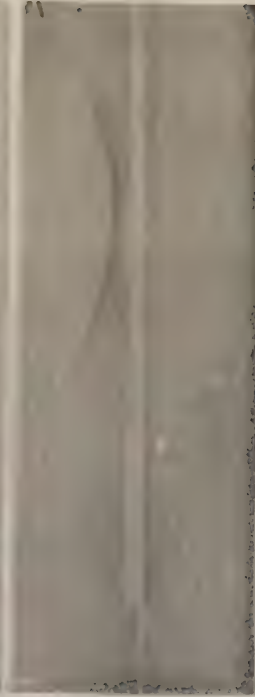
Electrophorèse sur gel d'amidon de chaînes légères monoclonales (BJ) Kappa et Lambda.

A et B = BJ Kappa. C D E F = BJ Lambda. G = BJ avec trace tubulaire.

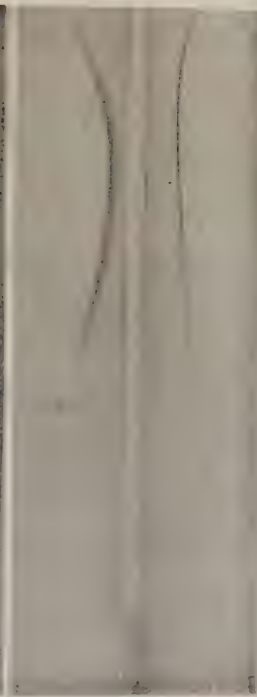
Remarquer les mobilités anodiques croissantes de C à A, et l'hétérogénéité importante des BJ : D E et F.



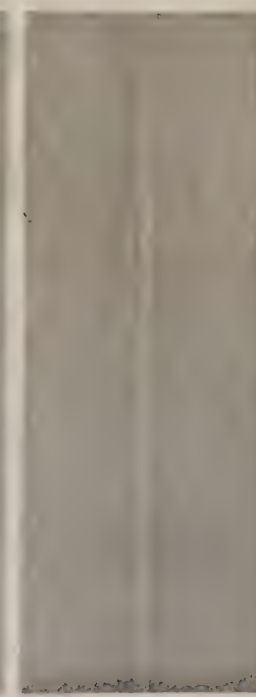
D



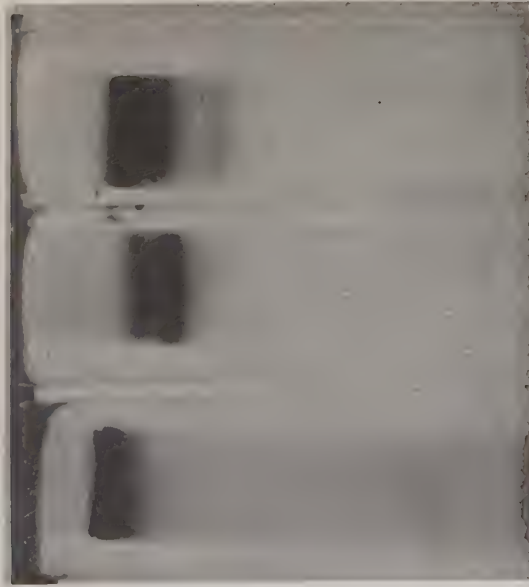
E



F



G



+

PHOTO XV : Immunoélectrophorèses au moyen d'immunsérums spécifiques de 6 chaînes légères (BJ) monoclonales.

Remarquer de D à G les mobilités anodiques décroissantes et en B la double courbure de l'arc Kappa. En C électrophorèse en polyacrylamide d'une chaîne légère homogène électrophorétiquement et de deux chaînes légères hétérogènes.

Les chaînes légères des immunoglobulines de mammifères se séparent en composants multiples lors de l'électrophorèse à pH neutre dans des gels contenant de l'urée (22). Elles existent alors sous forme de monomères : on peut, dans ce cas, constater la présence de 10 composants dont la différence en charge nette entre composants adjacents est probablement égale à 1 (42). Lorsqu'on supprime les agents responsables de la rupture des liaisons non covalentes, la dimérisation apparaît : STEVENSON (156) a montré que la dimérisation des chaînes légères est spécifique, attendu qu'elle apparaît entre monomères de même mobilité électrophorétique.

Ceci est valable aussi bien pour les chaînes légères normales que pour les chaînes légères monoclonales. Comme le fait remarquer FINE (44), la mobilité de ces chaînes légères monoclonales n'est pas obligatoirement superposable à celle du composant monoclonal présent dans le sérum. Enfin, l'excrétion de la protéine de Bence-Jones est, dans la majorité des cas, solitaire bien qu'elle s'accompagne parfois de protéines rencontrées dans les tracés tubulaires : (photo XIV, G). La grande majorité des myélomes étant indemne de lésions glomérulaires, nous n'avons jamais constaté de protéinuries de "Bence-Jones" : associées à des tracés de "protéinurie non sélective".

2°) ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE :

Les protéines de Bence-Jones, comme les chaînes légères de sujets normaux, peuvent se présenter sous différentes formes de polymérisation. Ainsi, peut-on trouver des monomères, des dimères stables : association de monomères liés par des ponts disulfure, et des dimères dissociables. Les monomères peuvent apparaître naturellement sans traitement dissociant préalable (54,172). Bien que les chaînes légères soient habituellement rencontrées sous la forme dimère, on peut trouver dans certains cas des polymères de PM plus élevé. C'est ainsi que GREY et KOHLER (64) ont rapporté un cas de protéinurie de Bence-Jones formée par un tétramère de chaîne légère Lambda, constituée d'une paire de dimères liés de façon non covalente : les dimères étant eux-mêmes formés de monomères reliés par des ponts disulfure. Il est remarquable que, dans ce cas, le malade n'excrétait pas la protéine dans son urine. Il a été montré qu'une différence d'environ 100 fois existe entre la clearance rénale d'une protéine d'un PM de 80 000 et une de 20 ou même 40 000 : ce qui signifie qu'un malade

excrétant 1 g. de monomère ou de dimère dans l'urine, par jour, n'éliminera que 10 mg de tétramère. Cependant, nous avons montré que l'on pouvait trouver dans les urines de malades atteints d'affections tubulaires, aussi bien que dans les urines normales (9), une quantité non négligeable de tétramères. Enfin, un dernier type de protéine relié aux chaînes légères a été trouvé dans les urines de sujets myélomateux : il s'agit d'un fragment de petit PM, de coefficient de sédimentation d'environ 1,2 S, apparaissant en petite quantité dans environ le tiers des urines de myélome : ce fragment, d'origine catabolique, est relié à la partie N-terminale de la chaîne légère, et ne réagit le plus souvent qu'avec l'immunsérum homologue de la protéine : ce fragment est antigéniquement déficient par rapport à la protéine de Bence-Jones complète.

Nous avons effectué des filtrations de chaînes légères monoclonales indifféremment de type Kappa ou Lambda sur gel de Sephadex G-100, en tampon phosphate (voir Techniques) ; après isolement des immunoglobulines par chromatographie sur DEAE-cellulose (voir Techniques). Dans ces conditions, seules les chaînes légères et les IgG sont obtenues et il n'est pas constaté de contamination par d'autres protéines d'origine plasmatique.

Ce milieu n'étant pas dénaturant, il est possible de mettre en évidence sur ce type de gel les différentes formes polymériques qu'elles soient ou non liées de façon covalente. Cependant, nous n'avons pas étudié de façon précise les différentes formes d'association susceptibles d'être rencontrées.

Les séparations sont réalisées sur le même type de colonne et dans les mêmes conditions que celles utilisées au chapitre : "Séparation des immunoglobulines de protéinurie tubulaire".

Les différentes courbes de filtration obtenues indiquent que, dans tous les cas étudiés, les chaînes légères passent en même position que celle obtenue pour le passage des dimères de chaînes légères de protéinurie tubulaire. Quatre fois sur cinq, et accompagnant cette fraction, nous avons obtenu un pic retardé en position probable du composant monomérique : cependant, nous ne sommes pas à même de dire s'il s'agit d'un fragment plus petit : nous ne possédons

pas, dans ces cas, d'immunsérums homologues de la protéine nous permettant de constater si cette protéine était déficiente par rapport au composant majeur. Dans deux cas, le composant majeur s'accompagne de deux pics très rapprochés. Enfin, dans trois cas, nous constatons le passage au Vo de la colonne de matériel agrégé, suivi d'IgG mises en évidence au moyen d'un immunsérum anti-Fc.

3°) ETUDE IMMUNOLOGIQUE :

a) Nous avons étudié trois immunsérums spécifiques de chaînes légères monoclonales de type Kappa, après immunisation de lapins par les chaînes légères séparées. Chacun de ces immunsérums a été testé en immunodiffusion vis-à-vis de six chaînes légères du même type. Chacune des protéines ayant été amenée à une concentration telle qu'elle donne une réaction de précipitation nette avec chacun des immunsérums.

Sur les trois immuno-diffusions réalisées (photo XVI haut), chacune des protéines homologues a été testée vis-à-vis de son immunsérum parallèlement à chacune des six autres chaînes légères monoclonales.

Des éperons sont visibles entre la protéine homologue et chacune des six autres chaînes légères, en particulier sur deux immuno-diffusions. Ces éperons matérialisent des différences antigéniques au niveau de ces protéines, dûes soit à la présence de sous-groupes des parties variables : [SALOMON (151) a, en effet, obtenu des réactifs anti-VKI, anti-VKII, anti-VKIII, de même que TISCHENFORD et coll. ont mis en évidence des sous-groupes de chaînes Lambda ; enfin, un immunsérum anti-V Lambda IV agglutinant a été décrit par RIVAT et coll.(131)], soit à la présence de spécificités idiotypiques qui peuvent être portées par la chaîne légère (65,145).

L'immunsérum L.135 (photo XVI) est encore capable de réagir avec sa protéine homologue, après absorption par une des protéines jugées déficientes. D'autre part, lorsque l'on teste les protéines qui sont apparues déficientes par rapport à une protéine et son immunsérum homologue, on constate qu'elles sont, entre-elles, en communauté antigénique (à l'exception d'un arc pour lequel le résultat est douteux).



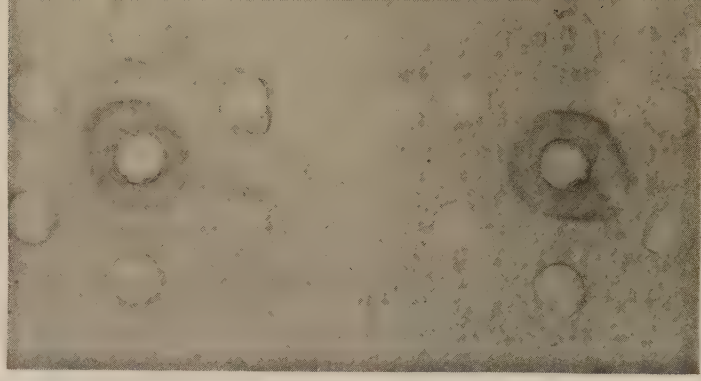
A

B

C

D

E



G

PHOTO XVI :

A.B.C. = immuno-diffusion de six chaînes légères monoclonales (Bence-Jones) avec trois immunosérums différents anti-chaînes légères. Dans chaque cas, la protéine formant éperon est la protéine homologue.

D.E.F. = immuno-diffusion des protéines déficientes, vis-à-vis des mêmes immunosérums.

G = immuno-diffusion de l'immunosérum B, absorbé par une protéine déficiente. L'immunosérum ne réagit plus qu'avec la protéine homologue.

Aucun argument décisif ne peut être tiré qui conduirait à penser que l'on est en présence ici d'une spécificité de sous-groupe, car nous ne possédions pas de chaînes légères de sous-classe connue. Il semble bien improbable, cependant, que chacun des immunosérums puisse révéler une spécificité de sous-groupe différente. Il paraît plus plausible de conclure que l'immunosérum qui révèle encore après absorption la protéine homologue, définit chez celle-ci une spécificité idiotypique (109,110,111,147,175).

b) Nous avons déjà évoqué le problème des "sites cachés". Les immunosérums anti-chaînes légères libres, provenant soit de chaînes légères "polyclonales", soit de chaînes légères "monoclonales" lorsqu'ils sont absorbés par du sérum humain normal ou des IgG, ne précipitent plus les IgG, mais sont encore réactifs vis-à-vis des chaînes légères libres. Il est probable que, dans ce cas, les sites antigéniques accessibles à ces immunosérums sont ceux-là mêmes qui sont cachés (hidden sites) à l'intérieur de la molécule d'IgG et seulement dévoilés dans la chaîne légère libre. Ce problème a donc un rapport étroit avec la structure quaternaire de la molécule. Il est remarquable, cependant, que nous avons obtenu facilement un anti-chaîne légère Lambda libre, alors que nous n'avons pas obtenu d'immunosérum anti-Kappa libre.

c) Comme nous l'avons à maintes fois rappelé dans ce travail, les déterminants antigéniques des protéines de Bence-Jones ont une communauté antigénique étroite avec les immunoglobulines : les différentes classes IgG, IgA, IgM, IgD, IgE ont toutes en commun les chaînes légères de type Kappa ou Lambda. EDELMAN et GALLY (31), PUTMAN et coll. (125), SCHWARTZ et EDELMAN (142) démontrèrent l'identité entre les chaînes légères des immunoglobulines et les protéines de Bence-Jones.

Cependant, toutes les classes d'immunoglobulines ne répondent pas exactement à la répartition Kappa 2/3 : Lambda 1/3 déjà signalée. C'est ainsi que les IgM de Waldenström sont de type Kappa en majorité et qu'à l'inverse 95% des IgD myélomateuses sont de type Lambda. C'est dans la partie C-terminale de la chaîne légère : C_L (CK ou CL) que résident les spécificités isotypiques Kappa ou Lambda.

Les immunosérums anti-chaîne légère Kappa ou Lambda de protéines de Bence Jones monoclonales, lorsqu'ils testent des protéines hétérologues, reconnaissent donc la partie constante, commune à toutes les protéines du même type.

Nous avons testé six protéines de Bence-Jones de type Kappa vis-à-vis de chaînes légères monoclonales de type Kappa provenant d'une IgM de Waldenstrom. Pour ce faire, le pic II de la séparation sur Sephadex G-100 de chaînes lourdes et légères d'IgM a été recueilli. Il contient exclusivement les chaînes légères de l'IgM (voir photo V et croquis III). Lorsque l'on teste en immuno-diffusion vis-à-vis d'un immunosérum anti-Kappa, les protéines de Bence-Jones en parallèle avec les chaînes légères d'IgM, tous les arcs apparaissent comme étant en communauté. Il n'existe donc aucune différence sensible dans la partie constante des chaînes légères Kappa d'IgM et celle des protéines de Bence-Jones du même type (photo XVII).

d) La moitié C-terminale des chaînes légères est donc constante, sauf dans quelques rares positions, où des échanges en relation avec des déterminants antigéniques sont connus. C'est ainsi que le locus Inv (134) conditionne trois motifs antigéniques Inv(1), Inv(2) et Inv(3). Ces allotypes sont transmis par trois allèles Inv¹, Inv^{1,2} et Inv³ (128,136,154), et sont localisés sur les chaînes légères de type Kappa, quels que soient les sous-groupes de la partie variable (VKI, VKII, VKIII). MILSTEIN (99) et BAGLIONI (4) ont montré que la transposition Leu/Val en position 191 est responsable respectivement des spécificités Inv(1,2) et Inv(3). Cependant, on ignore encore jusqu'à présent la structure responsable des Inv(1) ou Inv(2) puisqu'aucune chaîne légère Inv(1,-2) ou Inv(-1,2) n'a jusqu'alors été trouvée.

Cependant, la structure primaire n'est pas seule à déterminer la spécificité allotypique de la chaîne légère. TERRY et al (161) ont ainsi montré que seules les protéines IgG₁K et IgG₃K sont porteuses de telles spécificités. Ceci démontre, sans ambiguïté, l'influence de la structure quaternaire de la molécule d'IgG sur l'expression de la spécificité allotypique en général.

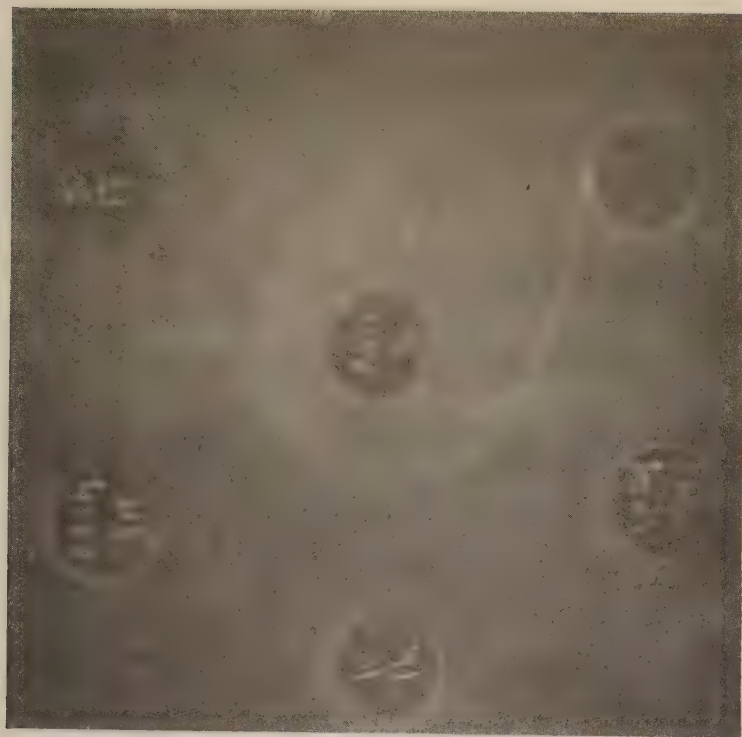
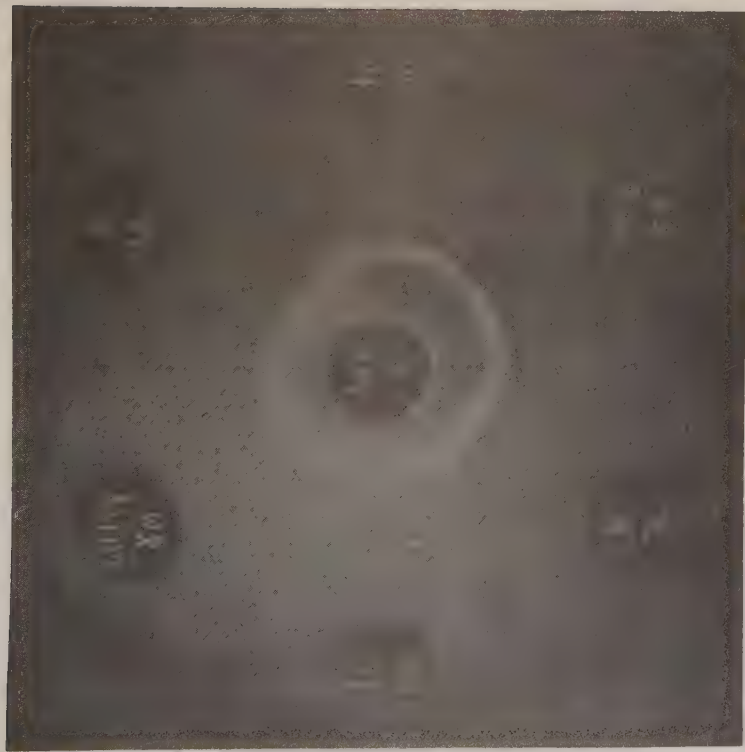


PHOTO XVII :

Immuno-diffusion de six chaînes légères monoclonales de type Kappa (protéines Bence -Jones) et de chaînes légères Kappa d'IgM, vis-à-vis d'un immunosérum anti-Kappa.

Il existe une communauté antigénique entre toutes les protéines testées.

La fréquence du phénotype Inv(1) dans la population normale est de 20%, alors que son expression est très nettement diminuée sur les fragments Fab isolés et sur les chaînes légères libres.

Nous avons testé 23 protéines de Bence-Jones provenant indifféremment de myélomes IgG Kappa, IgA Kappa, IgM Kappa ou de myélomes à Bence-Jones Kappa, et 9 chaînes légères polyclonales provenant de protéinuries tubulaires au moyen d'immunsérums agglutinants anti-Inv(1) et anti-Inv(2). Les techniques utilisées sont rapportées dans la thèse de L. RIVAT (132). Seules deux protéines, soit 6,87%, provenant l'une d'un myélome IgG Kappa, l'autre d'une macroglobulinémie sont porteuses des spécificités allotypiques Inv(1,2). Une de ces protéines : GAL : Inv(1,2,-3), a été étudiée par MILSTEIN (100). En effet, jusqu'à présent, on avait pu montrer avec certitude que l'échange Val/Leu pouvait se produire dans les deux sous-groupes (KI et KIII), mais seulement l'acide aminé [Val] responsable du marqueur Inv(3) avait été trouvé sur une des protéines de séquence de base II à cause de la fréquence faible des protéines de ce groupe et du marqueur Inv(1,2). Sur cette protéine Inv(1,2) et de séquence de base KII, MILSTEIN a pu montrer que, dans le peptide correspondant, le rapport Val/Leu était égal à 1/1, alors qu'il est de 3/1 dans les protéines Inv(3). La leucine, responsable du marqueur Inv(1,2), apparaît donc bien dans le sous-groupe KII.

LES FRAGMENTS ET LES PROTEINES "MONOCLONALES" ENTIERES -

1°) LES IgG :

Dans la plupart des cas de myélome ou de maladie de Waldenström et lorsqu'il existe une excrétion protéique urinaire, celle-ci est constituée par une chaîne légère monoclonale ou protéine de Bence-Jones. Cependant, il est parfois possible de mettre en évidence dans certaines affections rares proches du myélome, comme nous le verrons plus loin, des fragments de molécule d'IgG ou d'IgA antigéniquement différents des chaînes légères Kappa ou Lambda. Nous avons remarqué également que dans d'autres circonstances, l'excrétion protéique ne concerne pas ou peu les chaînes légères ou les fragments

lourds de la molécule d'IgG, mais la molécule entière identique à celle retrouvée dans le sérum du sujet myélomateux. Au cours de l'étude de telles protéinuries, il peut d'ailleurs exister une confusion entre la présence d'une protéine de Bence-Jones d'un type immunologique déterminé et la protéine monoclonale entière. En effet, l'étude conduite au moyen d'un immunosérum ne réagissant que contre une chaîne légère d'un seul type immunologique, peut amener à la conclusion que le composant mis en évidence est une protéine de Bence-Jones. Or, la protéine monoclonale, ne comportant par définition qu'un seul type de chaîne légère réagira d'une façon identique à la chaîne légère, vis-à-vis de cet immunosérum. De plus, le critère de la mobilité électrophorétique ne peut suffire à trancher le problème de la présence d'une molécule entière ou de sa seule chaîne légère, puisque ces deux constituants peuvent migrer dans les mêmes zones.

S'il est donc établi que les myélomateux excrètent le plus souvent l'un ou l'autre type de chaînes légères, il peut se produire que cette excrétion s'accompagne de la présence de la molécule entière ainsi que de fragments lourds, et même qu'elle ne soit constituée que par ces dernières protéines sans augmentation privilégiée d'une chaîne légère.

Nous nous sommes attachés, dans cette partie du travail, à étudier l'excrétion protéique dans les urines où la protéine de Bence-Jones ne représente pas toujours le composant majeur.

Nous avons étudié quatre protéinuries. Trois proviennent de sujets atteints de myélome IgG (FRE, LEB, CAR), la quatrième concerne une malade atteinte d'amylose généralisée (BEL') avec IgG monoclonale sérique. L'IgG sérique monoclonale a été isolée dans trois de ces cas et le type immunologique des chaînes lourdes déterminé au moyen des groupes Gm.

Localisation	Gm	CAR	BEL	FRE	LE*
Fc	1	-	+	-	
	8	?	-	+	
IgG	4	+	-	+	
Fab	17	-	+	-	

Détermination du type des chaînes lourdes de l'immunoglobuline monoclonale sérique au moyen des groupes Gm. (* Sérum non étudié).

R E S U L T A T S -

I- PROTEINURIE "FR" :

La protéine sérique myélomateuse est de type $(\gamma_1 \lambda)_2$.

La protéinurie est de 6°/∞. Elle comprend au niveau des immunoglobulines quatre constituants : un majeur constitué par une chaîne légère de type Lambda, une petite quantité de chaînes légères Kappa, la protéine monoclonale $(\gamma_1 \lambda)_2$ et, enfin, un fragment F'c.

En effet, l'immuno-électrophorèse de l'urine à 30°/∞ révèle vis-à-vis de l'anti-IgG polyspécifique jusqu'à quatre arcs de précipitation (photo XVIII). La chromatographie sur DEAE-cellulose, suivie de gel filtration sur Sephadex G-100 permet d'obtenir deux pics dont le premier contient une protéine possédant des parentés immunologiques avec les chaînes lourdes et les chaînes légères des IgG et, le second, des chaînes légères de type Kappa et Lambda. La protéine du pic I se raccorde avec des IgG normales et le contenu du pic II n'est pas homogène l'un des constituants est présent en faible quantité, le second en plus grande quantité, est déficient par rapport aux IgG normales (photo XVIII). La photo XIX montre que la protéine du pic I est également déficiente par rapport à des IgG normales puisque celles-ci éperonnent sur elle, mais cette protéine contient deux lignes de précipitation : pic I et chaînes légères Lambda ne se coupent pas.

Le pic II contient des chaînes légères Lambda et une seconde protéine coupant l'arc donné par le pic I, et n'ayant donc pas de communauté antigénique avec lui. Cette seconde protéine du pic II est définie (photo XIX) comme une chaîne légère de type Kappa : en effet, elle se raccorde complètement avec une chaîne légère Kappa, elle coupe le "pic I" qui ne contient que des chaînes légères de type Lambda, et elle est enfin déficiente par rapport à des IgG normales. La protéine du pic I, outre le déterminant Lambda, éperonne un fragment Fc d'IgG normales et possède donc un déterminant antigénique supplémentaire. L'étude des phénotypes Gm montre que le pic I contient du Gm(4), facteur porté par le fragment Fab de γG_1 . On peut donc conclure que cette dernière protéine est de type $(\text{IgG } 1 \lambda)_2$ et représente la protéine myélomateuse sérique.

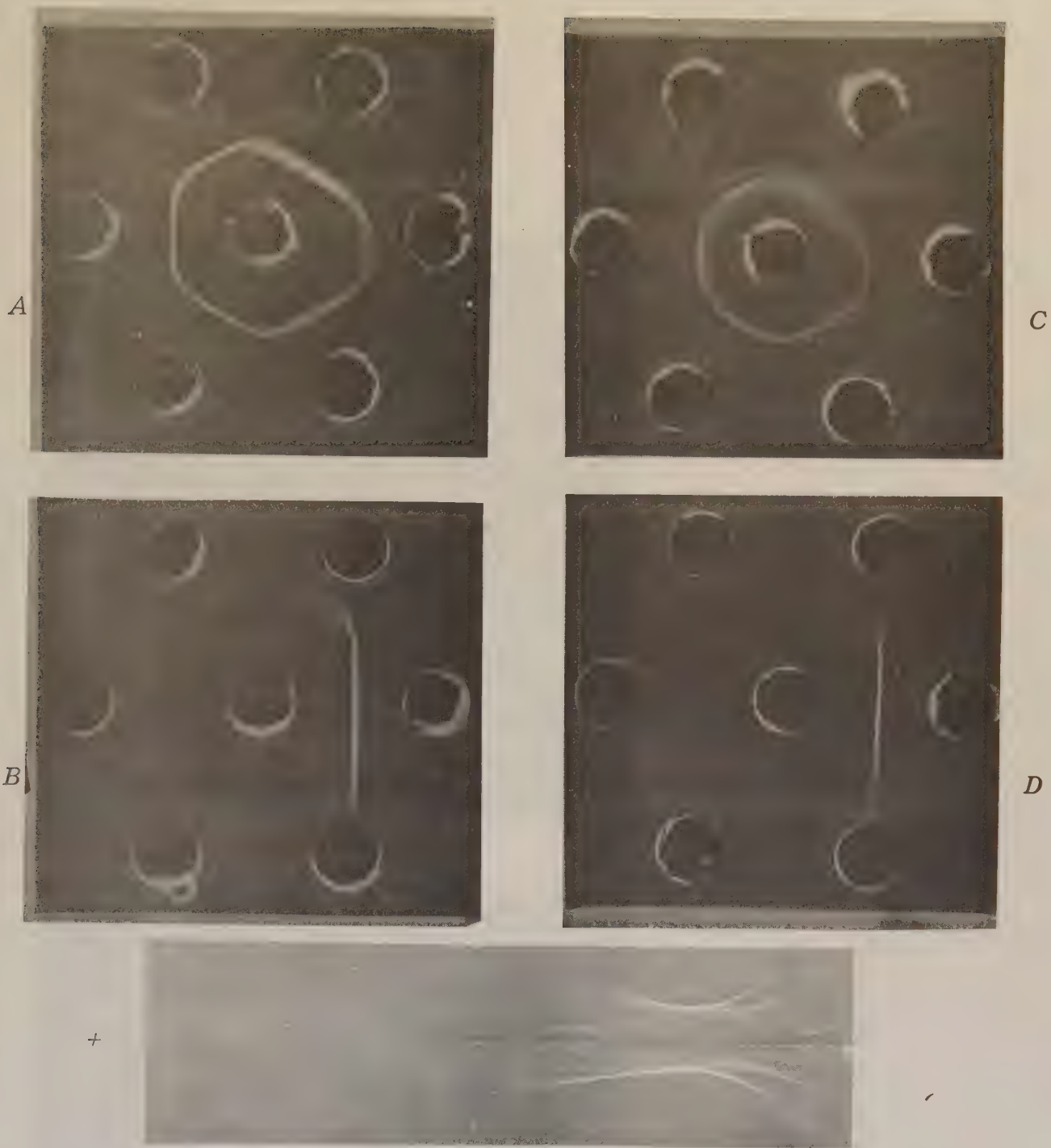


PHOTO XVIII :

A et B = Immuno-diffusion du pic I et C et D du pic II de Séphadex G 100. Les protéines sont diluées de droite à gauche, et de haut en bas de 1/1 à 1/512.

En B et D (à 15 heures) le témoin est constitué par des IgG normales.

E = Immuno-électrophorèse de l'urine concentrée à environ 30 ‰. (Voir texte).

L'immunsérum est un anti IgG polyspécifique (anti γ + L).



PHOTO XIX :

Immuno-diffusion des pics I et II (Voir texte), de protéines de Bence-Jones Kappa et Lambda, et d'IgG normales.

L'immunsérum est un anti IgG polypécifique (anti $\gamma + L$).

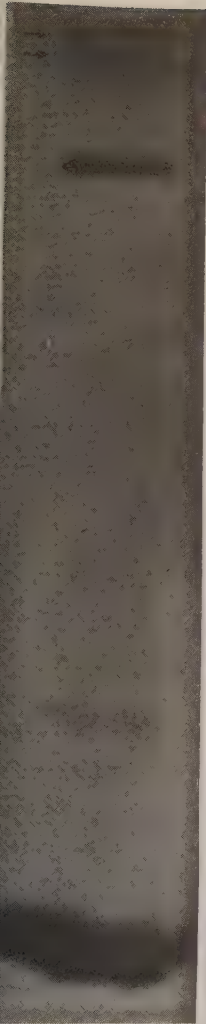
II-PROTEINURIE "CAR" :

La protéine myélomateuse est de type $(\gamma_1^k)_2$. La protéinurie est peu importante : $0,100 \text{ g}^\circ/\text{oo}$. L'électrophorèse en gel d'amidon de l'urine à $30^\circ/\text{oo}$ montre deux bandes étroites très cathodiques dans la zone gamma. Par immuno-électrophorèse, trois immunoglobulines sont mises en évidence : la protéine myélomateuse, un fragment apparenté au Fc d'IgG, enfin un fragment F'c.

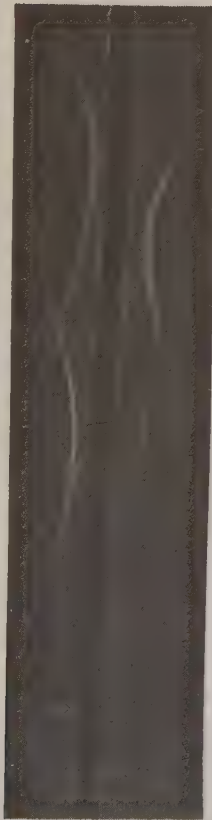
Ces dernières protéines ne réagissent ni avec des anti-IgA, ni avec des anti-IgM ; en revanche, vis-à-vis de l'anti-IgG polyspécifique, trois arcs sont visibles de la cathode à l'anode. (Photo XX) : un arc très convexe, un second arc éperonné par le premier, enfin un troisième arc également déficient par rapport au second. Seule la protéine la plus cathodique réagit avec un immun-sérum anti-Kappa. La position de ces arcs évoquant l'image obtenue avec des fragments d'IgG, nous avons comparé cette protéinurie avec des IgG normales fragmentées par la papaïne, en présence de cystéine. La photo XX montre que l'arc le plus cathodique "CAR" est légèrement décalé anodiquement par rapport au fragment Fab ; l'arc intermédiaire occupe une position presque symétrique par rapport au fragment F'c. Une seconde migration réalisée parallèlement à un fragment F'c isolé par électrophorèse préparative, montre une symétrie très étroite de ce fragment F'c par rapport à l'arc anodique "CAR". L'absorption de l'immunsérum anti-IgG par le fragment F'c ne révèle plus, d'une part l'arc F'c des fragments Fab + Fc + F'c et, d'autre part le troisième arc anodique de l'urine "CAR". Une immunodiffusion est réalisée en utilisant l'anti-IgG vis-à-vis d'IgG normales, du mélange "F" composé de Fab, Fc et F'c, de Fc et enfin de l'urine "CAR". Trois arcs sont révélés dans "F" : l'arc interne correspondant au Fab, l'arc intermédiaire au F'c, l'arc externe au Fc. Trois arcs sont discernables dans "CAR" : l'arc interne se raccorde au F'c et est en communauté partielle avec le Fc, l'arc externe rejoint le fragment Fab du mélange F ; enfin, le fragment Fc est en communauté partielle avec l'arc externe "CAR".

III-PROTEINURIE "LEB" :

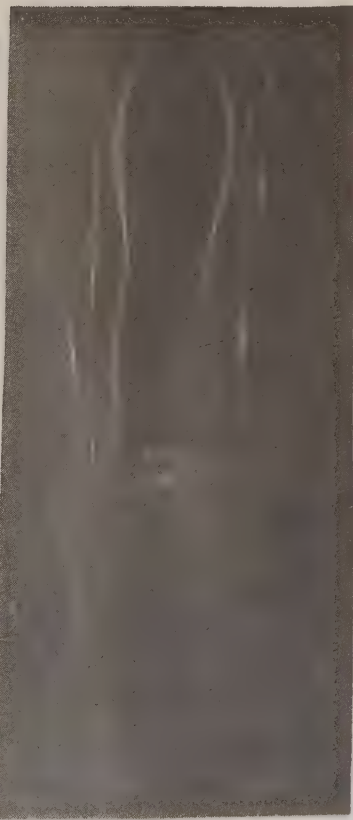
La protéine myélomateuse appartient au type $(\text{IgG}_1\lambda)_2$. La protéinurie du premier échantillon d'urine étudié est de $0,10^\circ/\text{oo}$,



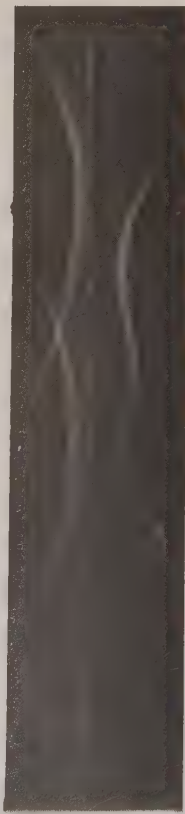
A



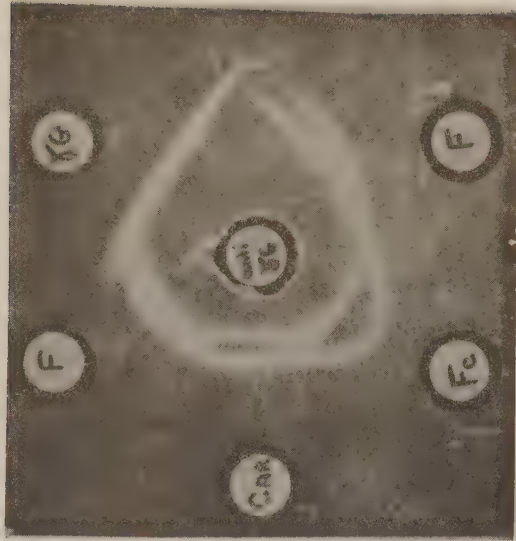
B



C



D



E

PHOTO XX : A = Electrophorèse en gel d'amidon de "CAR".

B = En haut : fragments d'IgG. En bas : urine "CAR" avec anti-IgG.

C = De haut en bas = F'c. Urine "CAR" - F'c. réservoir du haut : anti-IgG.
réservoir du bas : anti-IgG absorbé par F'c.

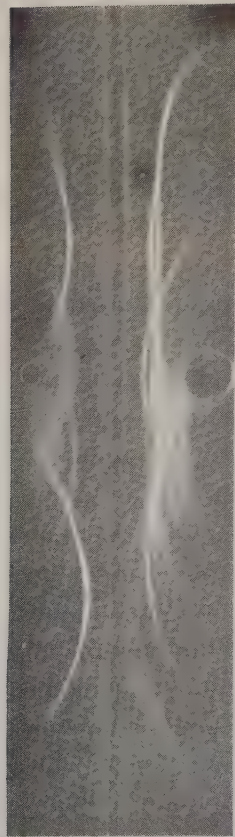
D = En haut : fragments d'IgG. En bas : urine "CAR" avec anti IgG absorbé par F'c.

E = Immuno-diffusion (voir texte).

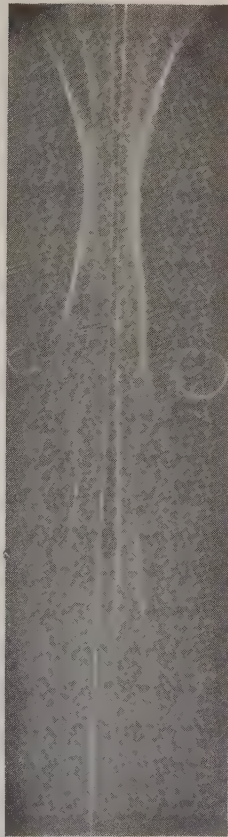
celle du second de 0,38 g°/°. Les deux urines sont amenées, chacune à une concentration de 30°/°. Du fait de cette différence de concentration protéique, les deux échantillons étudiés présentent quelques variations. Le premier, étudié au moyen d'un anti-IgG, montre un arc F'c, la protéine myélomateuse, et une chaîne légère Lambda, le second, au moyen d'un immunsérum total montre clairement la protéine myélomateuse s'inscrivant dans l'arc des IgG normales lorsque le volume d'antigène est augmenté (photo XXI A et B).

IV- PROTEINURIE "BEL" :

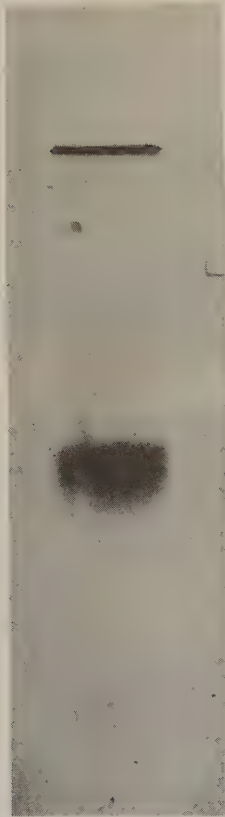
Chez ce malade, atteint d'amylose rénale, la protéine sérique monoclonale est de type (IgG₁ λ)₂. La protéinurie est de 4°/°. et de type non sélectif. L'isolement de la protéine sérique monoclonale ainsi que des immunoglobulines urinaires a été réalisé : l'ultracentrifugation analytique sur la protéine sérique donne un constituant à 6,46 S, alors que la protéine urinaire possède deux constituants : l'un de 7,22S_{20W}, l'autre de 3,4 S, le premier représentant 98% du mélange. Il est donc logique de penser que la protéine monoclonale est excrétée dans l'urine. De plus, les composants sérique et urinaire séparés ont, en électrophorèse sur gel d'amidon une mobilité strictement identique. L'analyse immunologique en double diffusion indique que les deux protéines sérique et urinaire sont en complète communauté antigénique ; en outre, une deuxième protéine est mise en évidence au niveau de l'urine (photo XXII). Celle-ci se relie totalement d'une part à des chaînes légères de type Kappa, d'autre part à des fragments Fab de type Kappa ; l'arc principal est coupé par des chaînes légères Kappa et forme un éperon sur des chaînes légères Lambda. La protéine principale possède donc des chaînes légères de type Lambda, mais possède d'autres déterminants antigéniques, alors que la seconde protéine ne semble contenir que des chaînes Kappa. Ces déterminants antigéniques supplémentaires sont communs aux chaînes lourdes gamma; en effet, à concentration telle que seule la protéine principale est mise en évidence, on constate qu'un fragment Fc est antigéniquement déficient par rapport à cette protéine. Enfin, la protéine étudiée est déficiente, antigéniquement, par rapport à des IgG normales. La protéine étudiée n'a également aucune communauté vis-à-vis de fragments Fab Kappa. Cette protéinurie est donc constituée au niveau des immunoglobulines de chaînes légères



A



B



C



D

PHOTO XXI :

A = (cas LEB). Après augmentation du rapport Ag / Ac, mise en évidence de la paraprotéine s'inscrivant dans l'arc des IgG normales.

B = (cas LEB). Mise en évidence de F'c, d'une chaîne légère, et de la paraprotéine.

C et D = (cas BEL). Mobilité électrophorétique identique de l'Ig sérique (D) et de l'Ig urinaire (C).

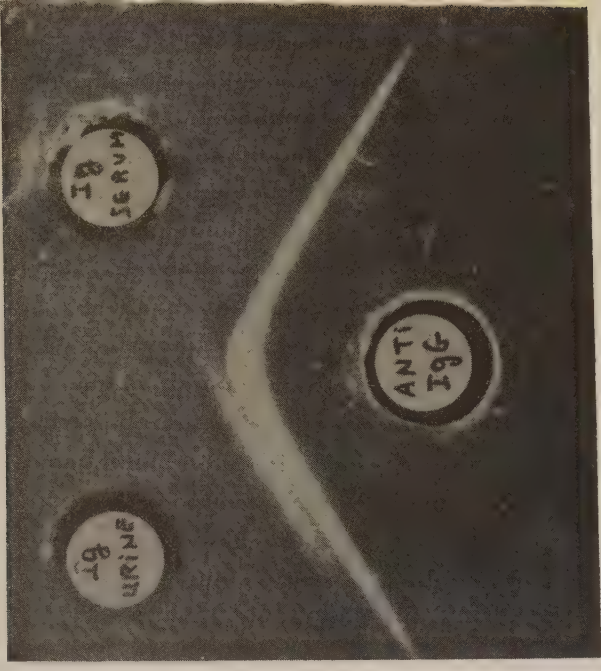
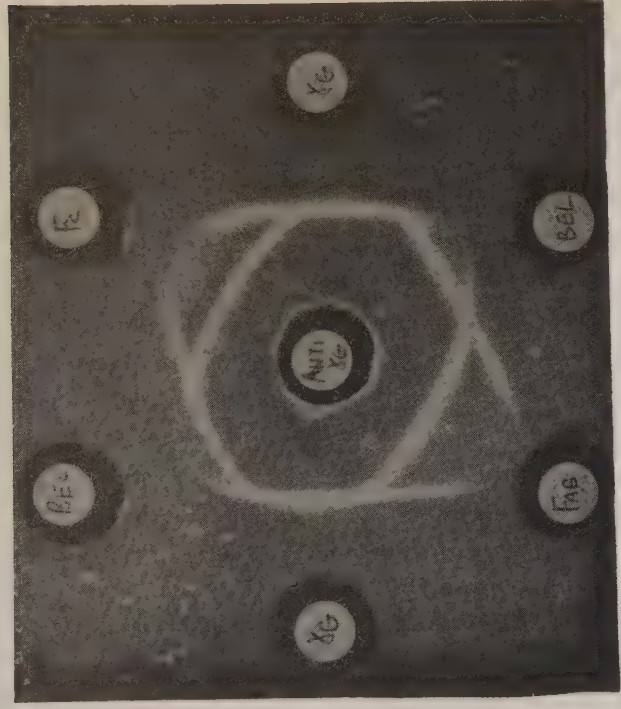
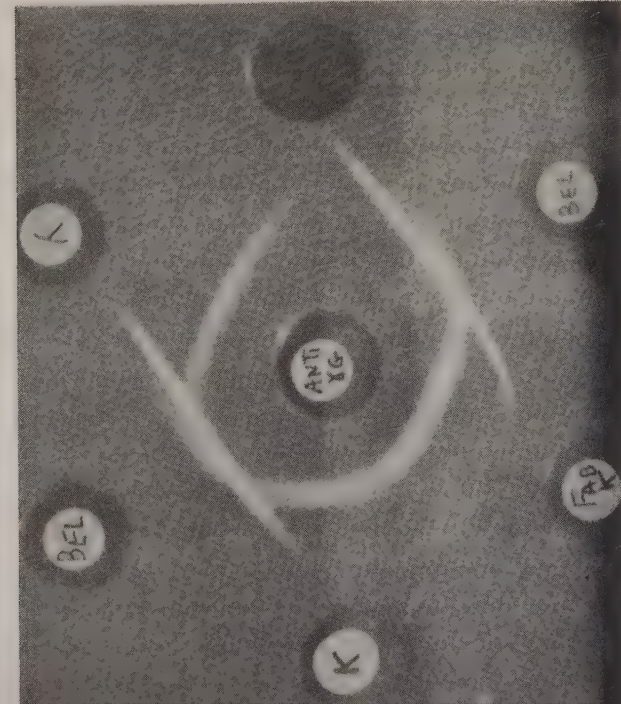


PHOTO XXII : Immuno-diffusions comparatives des Ig urinaires (BEL) au moyen d'un immunosérum anti IgG polypécifique
(Voir texte).

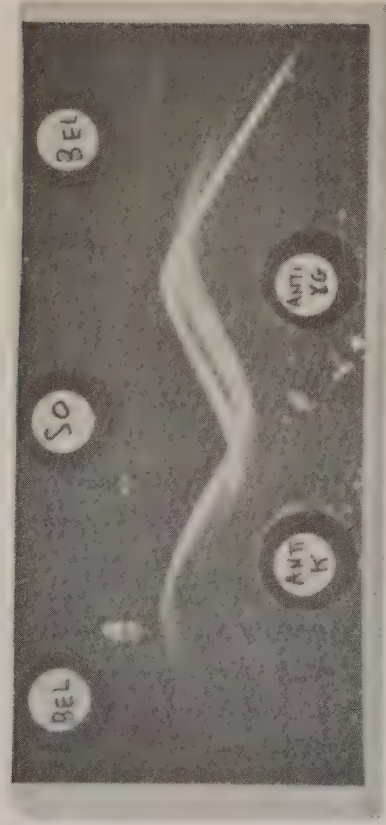
Kappa, en très faible proportion, sans qu'on puisse totalement exclure la présence d'un fragment Fab Kappa, et d'autre part d'une immunoglobuline $(\text{IgG}_1\lambda)_2$.

V- Nous avons étudié une chaîne légère de type Kappa qui possède certaines caractéristiques insolites que nous n'avons pu entièrement éclaircir. En immuno-électrophorèse, cette protéine réagit fortement avec un anti-Kappa, mais donne de plus un arc bifide avec un anti-IgG polyspécifique. En immuno-diffusion (photo XXIII), un des arcs obtenus est en communauté avec un fragment Fc. Cette protéine, en immuno-diffusion également, coupe un fragment Fab et ne se rattache qu'avec les protéines porteuses de déterminants lourds. La gel-filtration sur Sephadex G-100 de cette protéine donne deux pics principaux dont 67,65% de 3,78 S et 32,35% de 5,48 S.

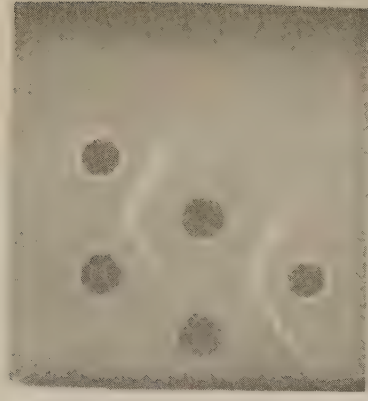
La protéine portant des déterminants de chaîne lourde est retrouvée dans le deuxième pic ; cette protéine possède donc un coefficient de sédimentation égal ou inférieur à 3,78 S. Il s'agirait donc probablement, dans ce cas, de l'excrétion de deux formes de polymérisation de chaînes légères, accompagnée d'un fragment lourd assez étroitement apparenté au Fc et non au F'c.

2°) LES AUTRES IMMUNOGLOBULINES :

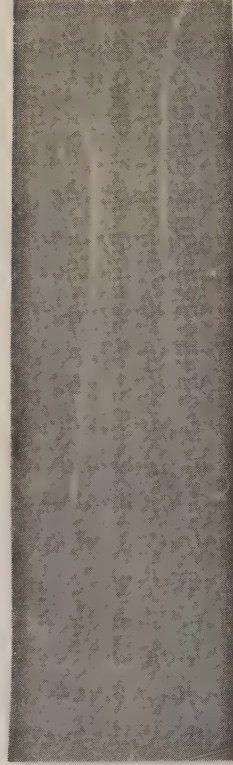
En dehors des myélomes à IgG ou à chaînes légères, nous avons étudié l'excrétion des immunoglobulines dans les myélomes IgA et les maladies de Waldenström. Nous avons pu y mettre en évidence les mêmes composants que ceux retrouvés dans les myélomes à IgG ou à chaînes légères, c'est-à-dire soit des chaînes légères monoclonales, soit les composants sériques eux-mêmes. Dans le premier cas, la chaîne légère représente de loin le composant majeur bien qu'elle soit fréquemment accompagnée d'une petite quantité de protéines "tubulaires": il n'existe pas ou très peu, dans ce cas, de protéines de PM élevé témoin d'une atteinte glomérulaire ; il faut cependant signaler que, comme dans les cas de cirrhose, on retrouve souvent dans l'urine des sujets atteints de maladie de Waldenström, une quantité non négligeable d'IgM, donc de PM élevé, alors même que les tracés sont indemnes des protéines sériques témoins de l'atteinte glomérulaire.



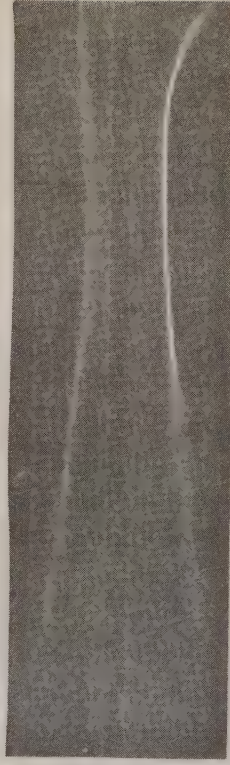
A



B



C



D

PHOTO XXIII :

Cas (V) : (voir texte).

En A et B, mise en évidence d'un " fragment lourd " et d'une chaîne légère Kappa.

B = réservoirs périphériques de droite à gauche et de haut en bas : anti IgG. anti K. fragment Fc. anti IgG.

Au centre : chaîne Kappa étudiée + " fragment lourd ".

C = IE avec anti Kappa.

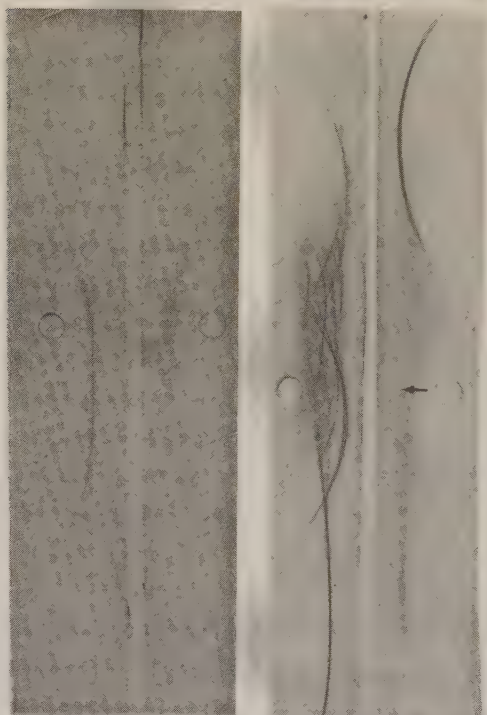
D = IE avec anti IgG polyspécifique. (la protéine étudiée est dans le réservoir supérieur).

Dans le second cas, il peut exister une atteinte glomérulaire et l'on retrouve alors, en plus ou non de la protéine de Bence-Jones, les composants sériques : IgA ou IgM monoclonales associés à une quantité plus ou moins importante de protéines, telles que la transferrine, l'albumine, certaines α_2 témoins de l'atteinte glomérulaire. Enfin, nous n'avons jamais pu mettre en évidence, au moyen des immunosérums anti- α ou anti- μ , de protéines rattachées au fragment Fc de ces immunoglobulines, comme c'est le cas pour le fragment F'c des IgG.

La photo XXIV montre les immuno-électrophorèses d'urines de deux myélomes IgA et d'une macroglobulinémie de Waldenström : cette dernière se caractérise par la présence d'une chaîne légère Kappa monoclonale et de l'IgM sur un fond très net de protéinurie tubulaire. Dans les deux myélomes à IgA, l'un possède une IgA de mobilité très lente, alors que le second a une IgA de mobilité rapide, et les indices de protéinurie "tubulaire" y sont moins nets.

LA MALADIE DES CHAINES LOURDES -

Une paraprotéinémie caractérisée sur le plan biologique par la production d'un fragment de molécule d'immunoglobuline semblable au fragment Fc des chaînes lourdes des IgG, associée sur le plan clinique à une hépatosplénomégalie, accompagnée sur le plan anatomicopathologique par une plasmocytose et une prolifération maligne de la lignée lymphocytaire, a été décrite en 1964 par FRANKLIN et coll. (51) sous le terme de maladie des chaînes lourdes. Dans le même numéro de la même revue, OSSERMAN et TAKATSUKI rapportent quatre autres cas de cette nouvelle affection (107). Chez ces cinq patients, existe une diminution des IgG normales : à chaque fois, une protéine identique à l'immunoglobuline anormale du sérum est retrouvée dans l'urine. Cette affection semble se caractériser par une relative rareté car, à notre connaissance, neuf cas de cette maladie ont été étudiés à ce jour (82,85,167,179). En dehors de la maladie des chaînes lourdes gamma, SELIGMANN (146) a décrit en 1968 une maladie des chaînes lourdes alpha : cette particularité immunochimique se retrouve dans le sérum de malades atteints de lymphome méditerranéen : l'urine de ces mêmes malades ne contient la protéine qu'en faible quantité.



A

B

C

PHOTO XXIV :

A = Urine de macroglobulinémie de Waldenström avec chaîne légère Kappa, et IgM complète.
 B et C = deux urines de myélome IgA : remarquer les mobilités très différentes des deux IgA.
 En haut, immunosérum Total ; en bas, anti alpha (B et C) et anti μ (A).

Enfin, très récemment, FORTE (48) a découvert dans le sérum d'un malade atteint de leucémie lymphoïde chronique à la fois un fragment d'IgM : chaîne lourde μ , et des chaînes légères Kappa libres ; l'origine intracellulaire de ce fragment a été étudiée par BUXBAUM (18). Il s'agit donc de la maladie des chaînes lourdes μ .

Dans le cas de la maladie des chaînes lourdes gamma, on a pu montrer (51) que cette "chaîne lourde" était en fait constituée d'un dimère de PM = 50 000 à 55 000, stabilisé par des ponts disulfure ; l'étude des cartes peptidiques a montré qu'il s'agissait d'une partie importante du fragment Fc et qu'il y avait identité antigénique entre la protéine sérique et la protéine urinaire.

EIN et WALDMANN (33) ont montré qu'une "chaîne lourde" IgG₃ avait le même comportement catabolique qu'une IgG₃ entière, et qu'en particulier sa période était identique à l'IgG₃ intacte ; le taux de synthèse de cette chaîne lourde étant très élevé, il s'agit donc bien d'un fragment synthétisé par l'organisme et non pas d'un produit catabolique. MILSTEIN et FRANGIONE, puis FRANKLIN et FRANGIONE (52,98) ont récemment étudié deux protéines de maladie des chaînes lourdes gamma : l'une appartient à la sous-classe IgG₃ = ZUC, la seconde à la sous-classe IgG₁ = CRA.

De grandes analogies ont été remarquées pour les deux protéines : ainsi, alors que les IgG₃ ont habituellement 5 ponts disulfure interchaîne lourde, il n'existe que 3 ponts disulfure dans ZUC et également 3 ponts disulfure dans CRA, alors que les IgG₁ normales ne possèdent que 2 ponts interchaîne lourde. De plus, le fragment Fd est pratiquement absent dans les deux protéines étudiées. La synthèse normale reprend pour les deux protéines au niveau de l'AA 216 (Glu) : le "gap" est d'environ 200 AA, débutant du 17ème à 18ème AA et se poursuivant jusqu'au 216ème. Il est donc remarquable que, dans les deux cas, la délétion du fragment Fd est à peu près de la même taille.

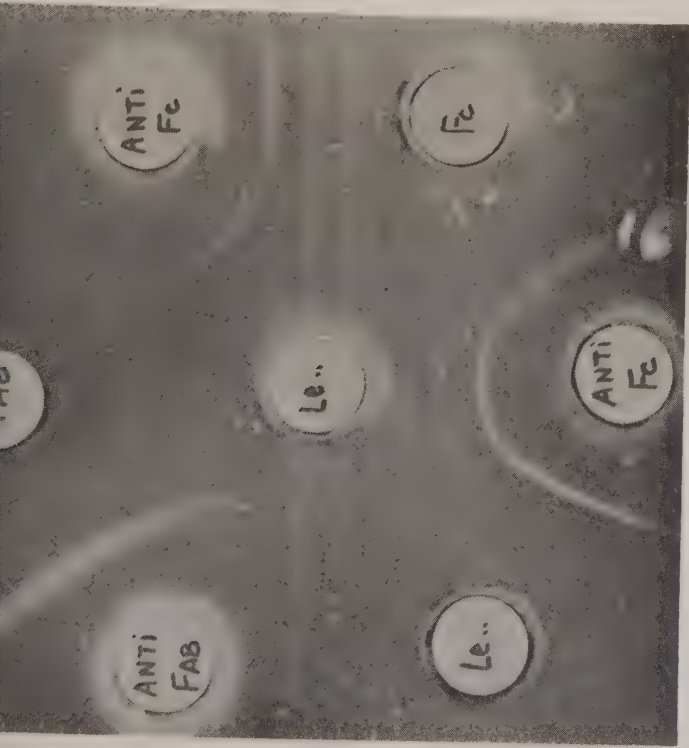
Etude d'un cas personnel :

Nous avons pu étudier personnellement un cas de maladie des chaînes lourdes gamma. L'étude clinique, radiologique et biologique a déjà été rapportée (85), et nous n'en décrivons ici que l'étude

immunochimique. Le sérum de la malade nous a été adressé afin de préciser la nature d'un bloc α_2 - β à l'électrophorèse sur papier. L'immuno-électrophorèse réalisée avec un immunsérum de cheval anti-sérum humain montre une diminution légère des pré-albumines et de l'albumine, pas de modification de la région α_1 , une diminution de l'haptoglobine. Dans la région β_1 , et sous la transferrine, s'étend un arc dont la corde est très importante. L'extrémité anodique de cet arc coupe l'arc α_2 M en son milieu. Cet arc anormal fait partie des immunoglobulines IgG puisqu'il se raccorde à la portion cathodique de l'arc des IgG normales. Ces dernières ne sont présentes ici que très faiblement par cette portion cathodique. Une preuve supplémentaire de la nature IgG de cet arc est donnée par un immunsérum anti-IgG humaines qui révèle la protéine anormale dans une position identique. Des immunsérums spécifiques anti-IgA et IgM indiquent que la protéine anormale n'a aucune parenté avec ces deux protéines. Il existe, cependant, une diminution importante des IgA, alors que les IgM sont normales. Les immunsérums anti-chaînes légères ne révèlent pas la protéine anormale.

La protéinurie est peu importante : 0,35 g°/‰ et la recherche de protéinurie de Bence-Jones par thermocoagulation à +56° négative.

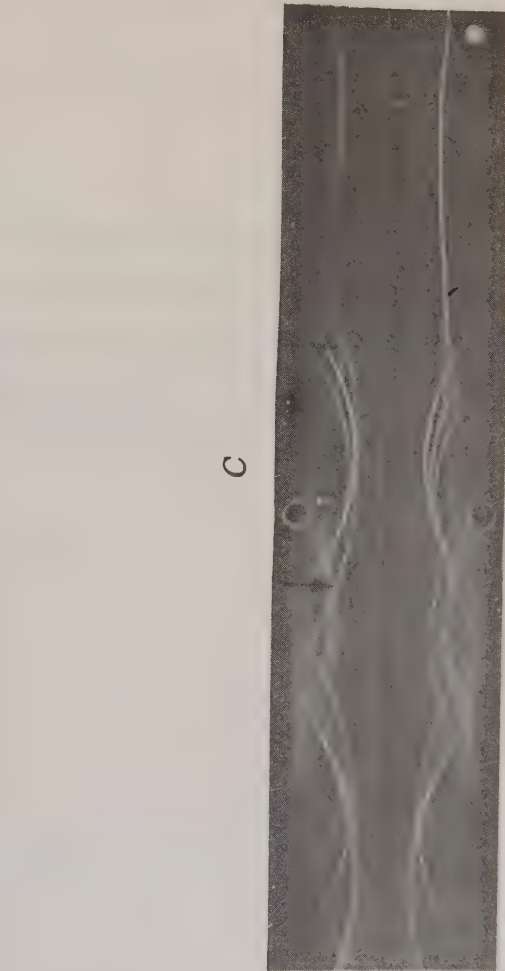
L'immuno-électrophorèse pratiquée sur l'urine n'ayant subi aucune concentration montre la présence d'un arc unique, convexe, de mobilité identique à l'arc de la paraprotéine sérique. Après précipitation par le sulfate d'ammonium 3 M, les contrôles ne montrent que de très faibles traces d'albumine et α_2 et un arc de mobilité intermédiaire β_2 - γ strictement identique à la paraprotéine sérique. Cet arc n'est révélé que par l'antisérum humain total et l'anti-IgG. La protéine est alors isolée sur DEAE-cellulose ; l'ultracentrifugation analytique de cette protéine isolée ne montre qu'un composant : son coefficient de sédimentation calculé à dilution infinie et à 20°C est de 3,9 S, ce qui indique un PM d'environ 56 000. L'étude immunologique du composant est entrepris par double diffusion au moyen de plusieurs immunsérums : anti-IgG polyspécifique, anti-Fab, anti-Fc d'IgG, anti-Kappa, anti-Lambda, et de six protéines : un fragment Fab, un fragment Fc, deux chaînes légères de type Kappa et Lambda, enfin la protéine urinaire. Les résultats obtenus indiquent



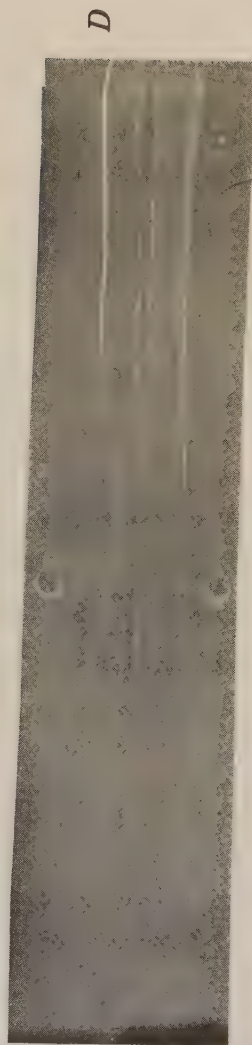
A



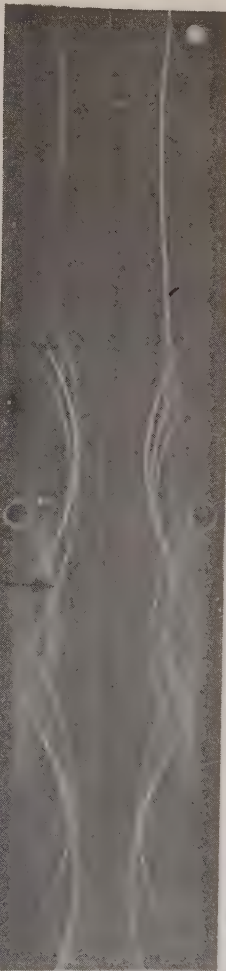
B



C



D



E

PHOTO XXV :

A et B = Immuno-diffusion de la protéine étudiée.

C = Immuno-électrophorèse du sérum étudié (en haut) : remarquer l'hypo IgG importante.

D et E = I.E. du sérum (D) avec un anti IgG et de la protéine lyophilisée (E) avec un immunosérum total.

(photo XXV) que la protéine urinaire possède les mêmes déterminants antigéniques que le fragment Fc, puisque les arcs obtenus fusionnent complètement ; en revanche, la protéine étudiée ne contient pas de fragment Fab, puisque l'anti-Fab ne réagit pas vis-à-vis de la protéine étudiée. La photo XXV indique également que la protéine étudiée est identique au fragment Fc.

Dans cette expérience, où les protéines sont étudiées au moyen d'un immunsérum polyspécifique anti-IgG, nous avons intercalé sur la plaque un fragment Fab, un fragment Fc, et une IgG, c'est-à-dire la structure moléculaire complète. On constate alors que l'IgG forme un éperon sur le fragment Fc, ce qui indique que l'IgG possède au moins un déterminant antigénique supplémentaire au fragment Fc. D'autre part, le fragment Fab coupe également le Fc et la protéine étudiée, ce qui prouve que le fragment Fab et le fragment Fc de la protéine étudiée sont antigéniquement différents.

A une concentration de 2 mg/ml, la protéine urinaire ne réagit ni contre un immunsérum de type Kappa, ni contre un immunsérum de type Lambda. En revanche, à une concentration de 4,5 mg/ml, l'on obtient un trait de précipitation avec l'anti-Kappa, ce qui permet de chiffrer approximativement à 2% le taux de chaînes Kappa présentes dans la préparation.

Enfin, cette protéine ne supporte que le facteur Gm(8). La spécificité allotypique Gm(8) est portée par le fragment Fc des IgG₁. Jointe à ce fait, la détermination de la sous-classe par précipitation en gel, au moyen des immunsérums spécifiques, a confirmé que cette protéine appartenait à la sous-classe IgG₁.

o

o

o

C O N C L U S I O N

Le rein ne peut retenir en totalité les protéines du plasma qu'il filtre en permanence : ainsi, les immunoglobulines, au même titre que certaines autres protéines, se retrouvent en faible quantité dans l'urine humaine normale.

Nous avons divisé notre travail en deux grands chapitres, envisageant successivement l'étude des immunoglobulines urinaires chez les sujets indemnes de certaines maladies hématologiques malignes, c'est-à-dire normaux ou porteurs de lésions rénales plus ou moins graves, puis chez ceux atteints de myélome multiple des os, de maladie de Waldenström ou d'affections apparentées.

Dans la protéinurie physiologique, l'excrétion des immunoglobulines est représentée principalement par les chaînes légères, éléments constitutifs mais non cataboliques des immunoglobulines, formant un pool commun pour toutes ces protéines ; les IgG et leur fragment F'c : produit catabolique y sont également détectés bien qu'en plus faible proportion. Enfin, les IgA y sont présentes en très faible quantité, alors que les IgM en sont absentes : il n'est pas possible de mettre en évidence des fragments lourds de ces dernières protéines.

L'apparition, dans l'urine, en quantité anormale de ces protéines peut être, ou bien la conséquence d'une atteinte rénale, ou bien le reflet d'une affection hématologique grave. Les immunoglobulines urinaires retrouvées dans les atteintes rénales ont été plus particulièrement étudiées sous l'angle des chaînes légères ainsi que des IgG ; ces dernières, en effet, en dehors des IgD et des IgE qui existent dans le sérum à des concentrations très faibles, représentent pondéralement plus de 5 fois la concentration sérique des IgA et 10 fois celle des IgM.

Sous leur aspect qualitatif, ces protéines ont été étudiées dans les protéinuries dites sélective, non sélective et tubulaire. Dans les tracés électrophorétique et immuno-électrophorétique du premier groupe, les immunoglobulines ne sont que très faiblement représentées, les IgM en étant absentes. Dans la protéinurie non sélective, les IgG et IgA sont présentes et les IgM très rarement, sauf dans les cas d'une forte augmentation sérique de cette protéine : encore faut-il remarquer que ces IgM ne sont pas tant retrouvées lorsque l'atteinte glomérulaire est importante, mais surtout quand la concentration sérique est élevée, s'accompagnant d'une augmentation des processus de diffusion au niveau glomérulaire. La présence du fragment F'c des IgG, et des chaînes légères est pratiquement toujours constante. Dans la protéinurie tubulaire, chapitre passionnant puisque, à l'heure actuelle, peu de protéines y sont identifiées avec certitude, l'excrétion des immunoglobulines se caractérise par la présence très importante des chaînes légères qui représentent la fraction prédominante des immunoglobulines dans ce type d'urine. Les IgG et les IgA sont moins abondantes que dans la protéinurie non sélective. Enfin, les IgM en sont toujours absentes. Nous avons étudié plus précisément dans ce chapitre les chaînes légères et le fragment F'c des IgG.

Dans une seconde partie, nous avons envisagé l'aspect quantitatif de l'excrétion des immunoglobulines dans les atteintes rénales. Au moyen d'une technique immunochimique de dosage des protéines, et en précisant les paramètres de la technique d'immuno-diffusion radiaire simple, en particulier les conditions de diffusion dans le gel des IgG et des chaînes légères, nous avons étudié quantitativement l'excrétion de ces dernières protéines, en nous attachant particulièrement aux chaînes légères Kappa. L'étude quantitative est une confirmation de l'analyse qualitative de ces protéines. Cependant, l'étude sans concentration préalable de l'urine est une approche plus sûre. En utilisant les urines étudiées sous les rubriques de l'analyse qualitative, nous avons constaté que la concentration des IgG est en relation directe avec le degré de l'atteinte rénale : de même, le dosage des chaînes légères, au même titre que les protéines de faible PM comme la ribonucléase ou le lysozyme, peut être considéré comme un indicateur de l'atteinte tubulaire. L'étude quantitative parallèle des IgG et des chaînes légères et la détermination de leur rapport

d'excrétion s'avèrent alors être un complément intéressant des autres examens de la fonction rénale. Dans certaines affections hématologiques, la présence d'Ig dans les urines est le témoin, le plus souvent, non pas d'une atteinte rénale, mais d'un trouble grave du métabolisme des immunoglobulines. Dans ce cas, les immunoglobulines sont représentées dans l'urine par une chaîne légère monoclonale d'un des deux grands types immunologiques : Kappa ou Lambda. Il est des circonstances, cependant, où l'excrétion est plus polymorphe et constituée par l'immunoglobuline monoclonale sérique et des fragments de celle-ci qu'accompagnent fréquemment d'autres globulines témoins, lors d'une atteinte rénale. Enfin, l'excrétion des immunoglobulines, dans le cas de maladie des chaînes lourdes, se fait sous forme de la "chaîne lourde" ou plus exactement du fragment de la chaîne lourde en cause. Nous avons étudié, dans cette dernière partie, ces différentes protéines sous l'aspect électrophorétique, chromatographique et immunologique.

Outre qu'elle a apporté et apporte encore des renseignements très intéressants pour ce qui concerne le catabolisme des immunoglobulines, et par là même a permis de préciser certains points de la structure de ces protéines, en particulier au niveau de la chaîne lourde des IgG et des chaînes légères, l'étude des immunoglobulines urinaires est un outil très efficace dans l'étude de la fonction rénale : ainsi, la présence des immunoglobulines ou des éléments constitutifs de celles-ci peut aider à la localisation de l'atteinte rénale. Enfin, dans certaines affections hématologiques graves, l'étude urinaire des immunoglobulines est un complément indispensable et impératif des examens cliniques et biologiques, apportant bien souvent un argument définitif au diagnostic.

o

o

o

B I B L I O G R A P H I E

- 1- ANDERSEN (S.B.), GLENERT (J.) and WALLEVIK (K.).
Gammaglobulin turn-over and intestinal degradation of gamma-globulin in the dog.
J. Clin. Invest., (1963), 42, 1873.

- 2- ANTOINE (B.) et NEVEU (Th.).
L'histurie. (Débit augmenté des macromolécules tissulaires dans certaines urines pathologiques).
Soc. Med. Hop. PARIS (1966), 117, 1023.

- 3- ASKONAS (B.A.) and WILLIAMSON (A.R.).
Some molecular aspects of antibody formation.
Antibiotica et Chemotherapia, (1969), 15, 64.

- 4- BAGLIONI (C.), ALESCIO ZONTA (L.), CIOLI (D.) and CARBONARA (A.).
Allelic antigenic factor Inv(a) of the light chains of human immunoglobulins : chemical basis.
Science, (1966), 152, 1519.

- 5- BENICE-JONES (H.).
Phil. Trans. B. (1848), 1, 55.

- 6- BENNICH (H.) and TURNER (M.W.).
The release of F'c and pF'c fragments from human immunoglobulin G following enzymic digestion : a time study.
Biochim. Biophys. Acta (1969), 175, 388.

- 7- BERGGARD (I.) and BENNICH (H.).
Fc fragment of immunoglobulin G in normal plasma and urine.
Nature, (1967), 214, 697.

- 8- BERGGARD (I.) and EDELMAN (G.M.).
Normal counterparts to Bence-Jones proteins : free L-polypeptides chains of human γ -globulin.
Biochemistry (1963), 49, 330.

- 9- BERGGARD (I.) and PETERSON (P.A.).
Polymeric forms of free normal Kappa and Lambda chains of human immunoglobulin.
The Journal of Biol. Chem. (1969), 244, 4299.

- 10- BERGGARD (I.) and PETERSON (P.).
Immunoglobulin components in normal human urine.
NOBEL SYMPOSIUM 3. Gamma-globulins : structure and control of biosynthesis. Ed. by J. Killander. Almquist and Wiksell/Gebbers Forlag AB STOCKHOLM. p.71, 1967.

- 11- BIENENSTOCK (J.).
Urinary Fc and F'c fragments.
J. of Immunol. (1968), 100, 280.

- 12- BIENENSTOCK (J.) and POORTMANS (J.R.).
 γ A in exercise proteinuria.
Proceed. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. (1970), 134, 138.

- 13- BIENENSTOCK (J.) and TOMASI (T.B.).
Clin. Res. (1967), 15, 292.

- 14- BOURRILLON (R.), CORNILLLOT (P.), MICHON (J.) et GOT (R.).
Chromatographie sur DEAE-cellulose des protéines urinaires précipitables par l'éthanol à 50%.
Clin. Chim. Acta (1963), 8, 513.

- 15- BRAMBELL (F.W.R.), HEMMINGS (W.A.) and MORRIS (I.G.).
A theoretical model of γ -globulin catabolism.
Nature, (1965), 203, 1352.

- 16- BURTIN (P.), HARTMANN (L.), HEREMANS (J.), SCHEIDEGGER (J.J.), WESTENDORP-BOERMA (F.), WIEME (R.), WUNDERLY (Ch.), FAUVERT (R.) et GRABAR (P.).
Etudes immunochimiques et immuno-électrophorétiques des macroglobulinémies
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., (1957), 2, 161.

- 17- BUTLER (E.A.) and FLYNN (F.V.).
The proteins of renal tubular disorders.
The Lancet, (1958), 2, 978.

- 18- BUXBAUM (J.), FRANKLIN (E.C.) and SCHARFF (M.D.).
Immunoglobulin M-heavy chain disease : intracellular origin
of the muchain fragment.
Science, (1970), 169, 770-773.

- 19- CAMERON (J.S) and BLANDFORD (G.)
The simple assessment of selectivity in heavy proteinuria.
The Lancet (1966), 30, 242.

- 20- CHINARD (F.P.), VOSSBURGH (G.J.) and EMS (T.).
Am. J. Physiol. (1955), 183, 221.

- 21- CIOLI (D.) and BAGLIONI (C.).
Catabolic origin of a Bence-Jones protein fragment.
The J. of Exp. Med. (1968), 128, 517.

- 22- COHEN (S.) and PORTER (R.R.).
Biochem J. (1964), 90, 278.

- 23- COHEN (S.), GORDON (A.H.) and MATTHEWS (C.).
Catabolism of γ -globulin by the isolated perfused rat liver.
Biochem J. (1962), 82, 197.

- 24- CORNILLLOT (P.), BOURRILLON (R.), MICHON (J.) et GOT (R.).
Isolement et caractérisation des γ -globulines urinaires.
Biochim. Biophys. Acta (1963), 71, 89.

- 25- CREYSSEL (R.).
Diagnostic value of Bence-Jones protein in proteins in normal
and pathological urine.
Ed. by Manuel (Y.) Revillard (J.P.) and Betuel (H.). S. Karger
Basel p.100. 1970.

- 26- CUNNINGHAM (B.A.), PFLUMM (M.N.), RUTISHAUSER (U.) and EDELMAN
(G.M.).
Subgroups of amino-acid sequences in the variable regions of
immunoglobulin heavy chain.
Proc. of the Nat. Acad. of Sci. (1969), 64, 997.

- 27- DELPECH (B.) et ROUSSEAU (P.Y.).

Dosage par immuno-diffusion radiale simple des γ G globulines et de la sidérophiline du liquide céphalo-rachidien normal.

Rev. Franç. Etudes Clin. Biol. (1969), XIV, 694-700.

- 28- DE VAUX St-CYR (C.) et HERMANN (G.).

Protides of the biological fluids. Proceedings of the 9th Colloquium. Bruges 1961, Elsevier, Amsterdam. p.326, 1962.

- 29- DIXON (F.J.), MAURER (P.H.) and DEICHMILLER (M.).

The half-life of homologous gamma-globulin (antibody) in several species,

J. Exp. Med., (1952), 96, 313.

- 30- EDELMAN (G.M.), CUNNINGHAM (B.A.), EINAR GALL (W.), GOTTLIEB (P.D.), RUTISHAVSER (U.) and WAXDAL (M.J.).

The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule
Proc. of the Nat. Ac. of Sci. (1969), 63, 78.

- 31- EDELMAN (G.M.) and GALLY (J.A.).

The nature of Bence-Jones proteins : chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins.

J. Exp. Med. (1961), 13, 861.

- 32- EIN (D.) and FAHEY (J.L.).

Two types of Lambda polypeptide chains in human immunoglobulins.
Science, (1967), 156, 947.

- 33- EIN (D.) and WALDMANN (T.A.).

Metabolic studies of a heavy chain disease protein.

The J. of Immunol. (1969), 103, 345.

- 34- ELLMAN (L.L.) and BLOCH (K.J.).

Heavy chain disease : report of a seventh case.

N. Engl. J. Med. (1968), 278, 1195.

- 35- ENGLE (R.L.) and NACHMAN (R.L.).

Two Bence-Jones proteins of different immunologic types in the same patient with multiple myeloma.

Blood, (1966), 27, 74.

- 36- EPSTEIN (W.V.), TAN (M.) and GROSS (M.).
Blocked antigenic sites on the L-chain of human gamma-globulin.
Nature (1964), 202, 1175.
- 37- EPSTEIN (W.V.), GULYASSY (P.F.), TAN (M.) and RAE (A.I.).
Effect of renal homotransplantation on the metabolism of the
light chains of immunoglobulins.
Annals of Int. Med. (1968), 68, 48.
- 38- FAHEY (J.L.) and ROBINSON (A.G.).
Factors controlling serum γ -globulin concentration.
J. Exp. Med. (1965), 122, 41.
- 39- FAHEY (J.L.) and Mc KELVEY (E.M.).
Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody
agar plates.
The J. of Immunol. (1964), 94, 84.
- 40- FALT (G.).
Les protéinuries des tubulopathies congénitales. Thèse Doct. Med.
Centre Régional de Doc. Pédag. LYON, 1963.
- 41- FARTHRING (C.P.), GERWING (J.) and SHEWELL (J.).
The catabolism of ^{131}I labelled homologous γ -globulin in normal
hyperthyroid and hypothyroid rats.
J. Endocr. (1960), 21, 83.
- 42- FEINSTEIN A.
Use of charged thiol reagents in interpreting the electrophoretic
patterns of immune globulin chains and fragments.
Nature (1966), 210, 135-137.
- 43- FEINSTEIN (D.) and FRANKLIN (E.C.).
Two antigenically distinguishable subclasses of human A myeloma
proteins differing in their heavy chains.
Nature (1966), 212, 1496-1498.
- 44- FINE (J.M.).
Clinical determination of Bence-Jones proteinuria in Proteins
in normal and pathological urines. Ed. by MANUEL (Y.), REVILLARD
(J.P.) and BETUEL (H.). S. Karger, Basel, p.92, 1970.

- 45- FINE (J.M.) et ROPARTZ (C.).
Techniques d'électrophorèse de zone.
Ed. de la Tourelle. 5 rue Guynemer 94-MANDE. p.45.
- 46- FLEURY (P.) et EBERHARD (R.).
Dosage photométrique par la méthode de biuret.
Ann. Biol. Clin. (1952), 10, 165.
- 47- FLYNN (F.V.) and PLATT (H.S.).
The origin of the proteins excreted in tubular proteinuria.
Clin. Chim. Acta (1968), 21, 377.
- 48- FORTE (F.A.), PRELLI (F.), YOUNT (W.J.), JERRY (L.M.), KOCHWA (S),
FRANKLIN (C.) and KUNKEL (H.G.).
Heavy chain disease of the μ (γ M) type. report of the first case.
Blood (1970), 36, 137.
- 49- FRANEK (F.), BRUMMELOVA (V.) and SKVARIL (F.).
Isolation and characterization of Kappa and Lambda chains of
normal γ G immunoglobulin.
Biochim. Biophys. Acta (1968), 160, 321.
- 50- FRANGIONE (B.), FRANKLIN (E.C.), FUDENBERG (H.). and KOSHLAND
(M.E.).
Structural studies of human G myeloma proteins of different
antigenic subgroups and genetic specificities.
J. Exp. Med. (1966), 124, 715.
- 51- FRANKLIN (E.C.), LOWENSTEIN (J.), BIGELOW (B.) and MELTZER (M.).
Heavy chain disease a new disorder of serum γ -globulins. Report
of the first case.
Amer. J. Med. (1964), 37, 332.
- 52- FRANKLIN (E.C.) and FRANGIONE (B.).
The molecular defect in the γ 1 heavy chain disease protein CRA
and its genetic implications.
Proc. Nat. Ac. Sci. (1971), 67, 187.
- 53- FRIBERG (L.).
Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with
special reference to chronic cadmium poisoning.
Acta. Med. Scand. (1950), 138, 124.

- 54- GALLY (J.A.) and EDELMAN (G.M.).

Protein-protein interactions among L-polypeptide chains of Bence-Jones proteins and human γ -globulins.

The J. of Exp. Med. (1964), 119, 817.

- 55- GITLIN (D.), KUMATE (J.), URRUSTI (J.) and MORALES (C.).

The selectivity of the human placenta in the transfer of plasma proteins from mother to foetus.

J. Clin. Invest. (1964), 43, 1938.

- 56- GLENNY (A.T.) and HOPKINS (B.E.).

Duration of passive immunity. Part I.

J. Hyg. (1922), 21, 142.

- 57- GLENNY (A.T.) and HOPKINS (B.E.).

Duration of passive immunity. Part II.

J. Hyg. (1923), 22, 12.

- 58- GORDON (D.A.), EISEN (A.Z.) and VAUGHAN (J.H.).

Studies on urinary gamma globulins in patients with rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheum. (1966), 9, 575.

- 59- GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.A Jr.).

Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines : application au sérum sanguin.

Biochim. Biophys. Acta (1953), 10, 193.

- 60- GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.A Jr.).

Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.

Biochim. Biophys. Acta (1955), 17, 65.

- 61- GRANT (G.H.).

The protéins of normal urine.

J. Clin. Path. (1957), 10, 360.

- 62- GREY (H.M.) and KUNKEL (H.G.).

Heavy chain subclasses of human γ G-globulin. Peptide and immunochemical relationships.

Biochem (1967), 6, 2326.

- 63- GREY (H.M.) and KUNKEL (H.G.).
H-chain subgroups of myeloma proteins and normal 7-S γ -globulins.
J. Exp. Med. (1964), 120, 253.
- 64- GREY (H.M.) and KOHLER (P.F.).
A case of tetramer Bence-Jones proteinaemia.
Clin. and Exp. Immunol. (1968), 3, 277.
- 65- GREY (H.M.), MANNIK (M.) and KUNKEL (H.G.).
Individual antigenic specificity of myeloma proteins. Characteristics and localization to subunits.
J. Exp. Med. (1965), 121, 561.
- 66- HALBERT (S.P.), GREENE (E.L.) and PALLAVICINI (C.).
"Tissue" antigens and enzymes in human urine in Protides of the Biological fluids. Proceedings of the sixteenth Colloquium. Ed. by H. Peters. Bruges. p.559, 1968.
- 67- HANSON (L.A.) and JOHANSSON (B.G.).
Studies on secretory IgA in Nobel Symposium 3. Gamma globulins : structure and control of Biosynthesis. Ed. by J. Killander. Almquist and Wiksell/Gebbers Forlag A.B. Stockholm. p.45, 1967.
- 68- HANSON (L.A.) and TAN (E.M.).
Characterization of antibodies in human urine.
J. Clin. Invest. (1965), 44, 703.
- 69- HARDWICKE (J.).
Renal clearance of serum proteins.
Clin. Chim. Acta (1968), 22, 45.
- 70- HARRISON (J.F.) and BLAINEY (J.D.).
Low molecular weight proteinuria in chronic renal disease.
Clinical Science. (1967), 33, 381.
- 71- HARRISON (J.F.), LUNT (G.S.), SCOTT (P.) and BLAINEY (J.D.).
Urinary lysozyme, ribonucléase and low molecular weight protein in renal disease.
The Lancet. (1968), 1, 371.

72- HENRY (R.J.).

Determination of protein in urine and cerebro-spinal fluid by turbidimetry with trichloroacetic acid.

In Clinical Chemistry. Principles and technics. London. Harper and Row. p.188, 1964.

73- HEREMANS (J.).

Les globulines sériques du système Gamma : leur nature et leur pathologie.

Masson et Cie, 1960.

74- HEREMANS (J.) and HEREMANS (M. Th.).

A new human serum protein : β_2 A globulin. Its isolation, properties and pathology.

4ème Congrès Intern. de Biochim. Vienne, 1958.

Abstracts p.195, Pergamon Press, Ltd. Londres, 1958.

75- HESS (M.), HILSCHMANN (N.), RIVAT (L.), RIVAT (C.) et ROPARTZ (C.)

Isotypes in human immunoglobulin Lambda chains.

Nature, (sous presse).

76- HILSCHMANN (N.).

The structure of the immunoglobulins (L. chains) and the antibody problem in : Nobel Symposium 3. Gamma globulins : structure and control of biosynthesis. Ed. by J. Killander. Almquist and Wiksell Gebers. Forlag. A.B. Stockholm. p.45, 1967.

77- HILSCHMANN (N.), PONSTINGL (H.), BACZKO (K.), BRAUN (D.), HESS (M.), SUTER (L.), BARNIKOL (H.U.) and WATANABE (S.).

The genetic control of antibody variability in 17th Colloquium on Protides of the Biological Fluids. Proceedings of the Seventeenth Colloquium. Bruges 1969. Ed. by Peters. Bruges. p.53, 1970.

78- IRIMAJIRI (S.), FRANKLIN (E.C.) and FRANGIONE (B.).

Some chemical and biological properties of the F₁c fragment of human γ G globulins.

Immunochem. (1968), 5, 383.

79- ISHIZAKA (K.) and ISHIZAKA (T.).

Physico-chemical properties of reaginic antibodies. I Association of reaginic activity with immunoglobulin other than gamma-A and gamma-G globulin.

J. Allergy (1966), 37, 169.

- 80- JOACHIM (G.R.), CAMERON (J.S.), SCHWARTZ (M.) and BECKER (E.L.).
Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome.
J. Clin. Invest. (1964), 43, 2332.
- 81- KORNGOLD (L.) et LIPARI (R.).
Multiple myeloma proteins III. The antigenic relationships of Bence-Jones proteins to normal gamma-globulins and myeloma serum proteins.
Cancer (1956), 9, 262.
- 82- KOSAKA (K.), OHTA (Y.), TSUJI (T.) and MIYAMOTO (C.).
A case report of heavy chain disease.
Clin. Immunol. (1969), 1, 57 (In Japanese).
- 83- KUNKEL (H.G.) and PRENDERGAST (P.A.).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1966), 122, 910.
- 84- LATERRE (E.C.), HEREMANS (J.F.) and CARBONARA (A.).
Immunological comparison of some proteins found in cerebrospinal fluid, urine and extracts from brain and kidney.
Clin. Chim. Acta (1964), 10, 197.
- 85- LEBRETON (J.P.), RIVAT (C.), RIVAT (L.), GUILLEMOT (L.) et ROPARTZ (C.).
Une immunoglobulinopathie méconnue : la maladie des chaînes lourdes.
La Presse Méd. (1967), 75, 2251.
- 86- LEBRETON (J.P.), RIVAT (C.), RIVAT (L.) et ROPARTZ (C.).
Les protéinuries des immunoglobulinopathies.
Rev. Franç. de Transf. (1968), XI, 331.
- 87- LEBRETON (J.P.), LEROY (J.), ROBERT (M.), DELAUNAY (P.), DORDAIN (M.), ROPARTZ (C.) et HUMBERT (G.).
Analyse électrophorétique des protéines urinaires.
Ouest Med. (1970), 8, 819.
- 88- LEBRETON (J.P.), MARTIN (J.P.), LEROY (J.), DORDAIN (M.), ROPARTZ (C.) et POORTMANS (J.R.).
On the occurrence of hitherto unknown proteins in the urine of an apparently healthy subject.
Clin. Chim. Acta (1971), 33, 101.

- 89- LEVI (D.F.), WILLIAMS (R.C. Jr), LINDSTROM (F.D.).
Immunofluorescent studies of the myeloma kidney with special reference to light chain disease.
Amer. J. Med. (1968), 44, 922.
- 90- LINDSTROM (F.D.), WILLIAMS (R.C.), SWAIM (W.R.) and FREEIER (E.F.).
Urinary light chain excretion in myeloma and other disorders : an evaluation of the Bence-Jones test.
The J. Lab. Clin. Med. (1968), 71, 812.
- 91- Mac KAY (E.) and SLATER (R.J.).
Studies on human proteinuria II. Some characteristics of the gamma globulins excreted in normal, exercise, postural and nephrotic proteinuria.
J. Clin. Invest. (1962), 41, 1638.
- 92- MANCINI (G.), CARBONARA (A.O.) and HEREMANS (J.F.).
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochem. (1965), 2, 235.
- 93- MANNIK (M.) and KUNKEL (H.G.).
Classification of myeloma proteins, Bence-Jones proteins and macroglobulins into two groups on the basis of common antigenic characters.
J. Exp. Med. (1962), 116, 859.
- 94- MANUEL (Y.), POLI (S.), BERNHARDT (J.P.), REVILLARD (J.P.), CLAUDEY (D.) and TRAEGER (J.).
Proteinuria in human renal allografts.
Helv. Med. Acta (1969), 35, 3.
- 95- MARTIN (J.P.).
Etat des connaissances actuelles sur la molécule de gamma M.
Ann. Biol. Clin. (1969), 27, 587.
- 96- MESKAKA (G.), SELIGMANN (M.), JACQUILLAT (C.), BASCH (A.) et BERNARD (J.).
Le traitement des myélomes par le melphalan.
La Presse Médicale, (1967), 75, 2301.

- 97- MIETTINEN (T.A.) and KEKKI (M.).
Effect of impaired hepatic and renal junction on ^{131}I B.J.
protein catabolism in human subjects.
Clin. Chim. Acta (1967), 18, 395.
- 98- MILSTEIN (C.) and FRANGIONE (B.).
Abnormalities in immunoglobulin synthesis : the heavy chain
disease protein ZUC.
In Behringwerk-Mitteilungen. Universitats und Verlagsbuchhandlung.
Marburg/Lahn. p.59, 1969.
- 99- MILSTEIN (C.).
Chemical structures of light chains.
Proc. Roy. Soc. (1966), 166, 138.
- 100- MILSTEIN (C.) MILSTEIN (C.P.) and JARVIS (J.M).
Occurrence of the Inv genetic markers in the subgroups of human
Kappa chains.
J. Mol. Biol. (1969), 46, 599.
- 101- NATVIG (J.B.), KUNKEL (H.G.) and JOSLIN (F.G.).
Delineation of two antigenic markers "non a" and "non g" related
to the genetic antigens of human γ globulin.
The J. of Immunol. (1969), 3, 611.
- 102- NISONOFF (A.), WISSLER (F.C.), LIPMAN (L.N.).
Properties of major components of peptic digest of rabbit
antibody.
Science (1960), 132, 1770.
- 103- Nomenclature for human immunoglobulins.
Bull. Org. Mond. Santé (1964), 30, 447.
- 104- OLHAGEN (B.), BIRKE (G.), PLAINTIN (L.O.) and AHLINDER (S.).
 ^{131}I γ globulin in hyperglobulinaemic states.
In Protides of the Biological Fluids. Proceedings of the eleventh
Colloquium. Ed. by H. Peters. Bruges. p.487, 1964.

- 105 - ORNSTEIN (L.) and DAVIS (B.J.).
Disc electrophoresis. Parts I and II.
Reprinted by distillation products industries, Eastman Kodak Co, 1962.
- 106- OSSERMANN (E.F.), GRAFF (A.), MARSHALL (M.), LAWLOR (D.) and GRAFF (S.).
Incorporation of N¹⁵L-aspartic acid into the abnormal serum and urine proteins of multiple myeloma (studies of the inter-relationship of these proteins).
J. Clin. Invest. (1957), 36, 352.
- 107 - OSSERMANN (E.F.) and TAKATSUKI (K.).
Clinical and immunochemical studies of four cases of heavy (H γ_2) chain disease.
Amer. J. Med. (1964), 37, 351.
- 108 - OUCHTERLONY (O).
Diffusion in gel methods for immunological analysis.
Progr. Allergy Karger, Basel/New York, 5, 1.
- 109 - OUDIN (J.) et MICHEL (M.).
Une nouvelle forme d'allotypie des globulines du sérum de lapin apparemment liée à la formation et à la spécificité anti-corps.
C.R. Ac. Sci. (1963), 257, 805.
- 110 - OUDIN (J.) et MICHEL (M.).
Sur les spécificités idiotypiques des anticorps de lapins anti-S-typhi.
C. R. Ac. Sci. (1969), 268, 230.
- 111 - OUDIN (J.).
The genetic control of immunoglobulin synthesis.
Proc. Roy. Soc. Ser.B. Biological Sciences.(1966), 166, 207.
- 112 - PATTE (J.C.), BALDASSAIRE (G.) et LORET (J.).
Etude immuno-électrophorétique des protéinuries normale et pathologique.
Rev. Franç. Etd. Clin. Biol. (1958), 3, 960.

- 113- POLMAR (S.H.) and STEINBERG (A.G.).

The effect of the interaction of heavy and light chains of IgG on the Gm and Inv antigens.

Biochem, Genetics. (1967), 1, 117.

- 114- POORTMANS (J.R.).

Urinary excretion of a γ M related substance following muscular exercise.

Nature (1969), 221, 376.

- 115- POORTMANS (J.R.) and VAN KERCHOVE (E.).

Clin. Chim. Acta (1962), 7, 229.

- 116a-POORTMANS (J.R.).

The level of plasma proteins in normal human urine in Protides of Biological Fluids. Ed. by H. Peeters. Bruges, p.603, 1968.

- 116b-POORTMANS (J.R.).

Proteinuria after muscular work in Proteins in normal and pathological urine. Ed. by MANUEL (Y.), REVILLARD (J.P.) et BETUEL (H.). S. Karger. Basel p.229, 1970.

- 117- POORTMANS (J.R.).

Les globulines de la protéinurie d'effort.

Clin. Chim. Acta (1965), 12, 238.

- 118- PORTER (R.R.).

Structure of gamma globulins and antibodies.

In basic problems in neoplastic diseases. Columbia University. Press. New-York p.177, 1962.

- 119- PORTER (R.R.).

The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papaïn.

Biochem J. (1959), 73, 119.

- 120- POULIK (M.D.)

F_c fragment of immunoglobulins.

Nature, (1966), 210, 133.

- 121- PRESS (E.M.) and PIGGOTT (P.J.).
The chemical structure of the heavy chains of immunoglobulin G.
In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XXXII.
Cold spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology. Cold
Spring Harbor. New-York. p.45, 1967.
- 122- Proteins in normal and pathological urine. Ed. by MANUEL (Y.),
REVILLARD (J.P.) et BETUEL (H.). S. Karger. Basel, Part V : Protéi-
nuria after renal transplantation. 271-309, 1970.
- 123- PUTNAM (F.W.).
Structural evolution of Kappa and Lambda light chains.
In Nobel Symposium 3. Gamma globulins : structure and control of
biosynthesis. Ed. by J. Killander. Almsuist and Wiksell/Gebers
Forlag. A.B. Stockholm. p.45, 1967.
- 124- PUTNAM (F.W.) and MIYAKE (A.).
Proteins in multiple myeloma. III Origin of Bence-Jones proteins.
J. Biol. Chem. (1955), 212, 361.
- 125- PUTNAM (F.W.), EASLEY (C.W.) and HELLING (I.W.).
Structural study of human γ -globulin through the analysis of the
tryptic peptides of Bence-Jones proteins.
Biochem. Biophys. Acta (1963), 78, 231.
- 126- REMINGTON (J.S.), SCHAFER (I.A.)
Transport piece in the urines of premature infants.
Nature (1968), 217, 364.
- 127- REVILLARD (J.P.) et MANUEL (Y.).
Les protéinuries. Valeur séméiologique de leur étude électropho-
rétique.
Ed. Camugli. Lyon, 1965.
- 128- RITTER (H.), ROPARTZ (C.), ROUSSEAU (P.Y.), RIVAT (L.) und
WALTER (H.).
Formale genetik und populationsgenetik des Inv-polymorphismus.
Blut. (1966), 13, 373.
- 129- RIVAT (C.), RIVAT (L), LEBRETON (J.P.), ROUSSEAU (P.Y.) et
ROPARTZ (C.).
Les γ -globulines résiduelles et les fragments des immunoglobulines
humaines, obtenus par action de la papaïne, avec ou sans cystéine.
Etude immunologique et allotypique.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1968), 50, 997.

- 130 - RIVAT (C.), ROPARTZ (C.) et ROWE (D.S.).
Antigenic heterogeneity of human IgD immunoglobulins.
Nature, in press.
- 131 - RIVAT (L.), RIVAT (C.), ROPARTZ (C.) and HESS (M.).
Subtypes in immunoglobulin Lambda chains.
Rev. Europ. Et. Clin. Biol. (sous presse).
- 131bis-RIVAT (L.).
Système Gm, Inv, ISf et immunoglobulinopathies.
Thèse Doc. Med. Ed : Centre Départemental de Transfusion
Sanguine et de Génétique Humaine 76-ROUEN-BOIS-GUILLAUME, 1967.
- 132 - RIVAT (L.), RIVAT (C.), LEBRETON (J.P.) et ROPARTZ (C.).
Les facteurs Gm, Inv et ISf des urines normales.
In Protides of the Biological Fluids. Proceedings of the 16th
Colloquium. Bruges 1968. Pergamon Press, p.593, 1969.
- 133- ROGENTINE (G.N.Jr.), ROWE (D.S.), BRADLEY (J.), WALDMANN (T.A.)
and FAHEY (J.L.).
Metabolism of human immunoglobulin D (IgD).
J. Clin. Invest. (1966), 45, 1467.
- 134 - ROPARTZ (C.).
Immunoglobulines humaines et fonctionnement génétique.
Rev. Transf. (1969), XII, 85.
- 135 - ROPARTZ (C.), LENOIR (J.) et RIVAT (L.).
A new inheritable property of human sera : the Inv factor.
Nature, (1961), 189, 586.
- 136- ROPARTZ (C.), RIVAT (L.) et ROUSSEAU (P.Y.).
Deux nouveaux facteurs dans les systèmes héréditaires de
gamma-globulines : le Gm(e) et l'Inv(1).
Proc. 9th Congr. Int. Soc. Blood Transf. Mexico, p.445, 1962.
- 137- ROWE (D.S.) and FAHEY (J.L.).
New class of human immunoglobulin. II Normal serum IgD.
J. Exp. Med. (1965), 121, 185.

- 138 - ROWE (D.S.) and FAHEY (J.L.).
New class of human immunoglobulin. I An unique myeloma protein.
J. Exp. Med. (1965), 121, 171.
- 139- ROWE (D.S.) and SOOTHILL (J.F.).
Serum proteins in normal urine.
Clin. Science (1961), 21, 75.
- 140 - RUNDLES (R.W.), COOPER (G.R.) and WILLETT (R.W.).
Multiple myeloma IV. Abnormal serum components and Bence-Jones proteins.
J. Clin. Invest. (1951), 30, 1125.
- 141 - SCHEIDEGGER (J.J.).
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Inter.Arch.Allergy. Appl. Immunology (1955), 7, 103.
- 142- SCHWARTZ (J.H.) and EDELMAN (G.M.).
Comparisons of Bence-Jones proteins and L-polypeptide chains of myeloma globulins after hydrolysis with trypsin.
J. Exp. Med. (1963), 118, 41.
- 143- SCHULTZE and HEREMANS (J.).
Molecular biology of human proteins with special reference to plasma proteins.
Vol. I, Ed. by ELSEVIER. p.673, 1966.
- 144- SCHULTZE and HEREMANS (J.).
Molecular biology of human proteins with special reference to plasma proteins.
Vol.I, Ed. by ELSEVIER, p.719, 1966.
- 145- SELIGMAN (M.), MESHAKA (G.), HUREZ (D.) and MIHAESCO (C.).
Studies on the reaction of individual antigenic specificity of YG type myeloma globulins. IVth International Symposium on immunopathology. Monaco, 1965, P. GRABAR and P. MIESCHER. Eds. Schwabe Basel, p.229, 1966.
- 146 - SELIGMAN (M.), DANON (F.), HUREZ (D.), MIHAESCO (E.) and PREUDHOMME (J.L.).
Alpha chain disease. A new immunoglobulin abnormality.
Science (1968), 162, 1396.

- 147 - SLATER (R.J.), WARD (S.M.) and KUNKEL (H.G.).
Immunologic relationships among the myeloma proteins.
J. Exp. Med. (1955), 101, 85.
- 148 - SMITH (J.C.), WELLS (A.R.) and KENCH (J.E.).
Brit. J. Ind. Med. (1961), 18, 70.
- 149- SOLOMON (A.), KILLANDER (J.), GREY (H.M.) and KUNKEL (H.G.).
Low molecular weight-proteins related to Bence-Jones proteins
in multiple myeloma.
Science, (1966), 151, 1237.
- 150 - SOLOMON (A.), WALDMANN (T.A.), FAHEY (J.L.) and Mc FARLANE (AS).
Metabolism of Bence-Jones proteins.
J. Clin. Invest. (1964), 43, 103.
- 151- SOLOMON (A.) and Mc LAUGHLIN (C.L.).
Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins.
II. Immunochemical differentiation and classification of Kappa
chains.
J. Exp. Med. (1969), 130, 1295.
- 152- SPIEGELBERG (H.), FISKLIN (B.) and GREY (H.).
Catabolism of γ G myeloma proteins of different subclasses in
man.
Fed. Proc. (1968), 27, 731.
- 153 - STEIN (S.), NACHMAN (R.L.), ENGLE (R.L.).
Individual and sub-group antigenic specificity of Bence-Jones
protein .
Nature, (1963), 200, 1180.
- 154 - STEINBERG (A.G.), WILSON (J.) and LANSET (S.).
A new human gamma globulin factor determined by an allele at
the Inv locus.
Vox Sang. (1962), 7, 151.
- 155 - STEVENSON (G.T.).
Detection in normal urine of protein resembling Bence-Jones
protein.
J. Clin. Invest. (1962), 41, 1190.

- 156- STEVENSON (G.T.) and STRAUS (D.).
Specific dimerization of the light chains of human immunoglobulin.
Biochem. J. (1968), 108, 375.
- 157- STROBER (W.), WOCHNER (R.D.), BARLOW (M.H.), Mc FARLIN (D.E.) and WALDMANN (T.A.).
Immunoglobulin metabolism in ataxia-telangiectasia.
J. Clin. Invest. (1968), 47, 1905.
- 158- TAKATSUKI (K.) and OSSERMAN (E.F.).
Demonstration of two types of low molecular weight γ -globulins in normal urine.
The J. Immunol. (1964), 92, 100.
- 159- TAN (M.) and EPSTEIN (M.W.).
A direct immunologic assay of human sera for Bence-Jones proteins (L.chains).
J. Lab. Clin. Med. (1965), 66, 344.
- 160- TERRY (W.D.) and FAHEY (J.L.).
Subclasses of human γ_2 globulin based on differences in the heavy polypeptide chains.
Science, (1964), 146, 400.
- 161- TERRY (W.D.), FAHEY (J.L.) and STEINBERG (A.G.).
Gm and Inv factors in sub-classes of human IgG.
J. Exp. Med. (1965), 122, 1087.
- 162- TERRY (W.D.) and ROBERTS (M.S.).
Antigenic heterogeneity of human immunoglobulin A proteins.
Science, (1966), 153, 1007.
- 163- TISCHENDORF (F.W.), TISCHENDORF (M.M.) and OSSERMAN (E.F.).
Subgroup specific antigenic marker on immunoglobulin Lambda chains : identification of three subtypes of the variable region.
J. Immunol. (1970), 105, 1033.
- 164- TISELIUS (A.) and KABAT (E.A.).
Electrophoresis of immune serum.
Science, (1938), 87, 416.

- 165- TITANI (K.), WHITLEY (E.), AVOGARDO (L.) and PUTNAM (F.W.).
Immunoglobulin structure, partial amino acid sequence of a Bence-Jones protein.
Science, (1965), 149, 1090.
- 166- TOMASI (T.), TAN (E.M.), SOLOMON (A.) and PRENDERGAST (R.).
Characteristics of an immune system common to certain external secretion.
J. Exp. Med. (1965), 121, 101.
- 167- TSUJI (T.) and OHTA (Y.).
Heavy chain (Fc fragment) disease. Report of a ninth case.
Acta Haem. Jap. (in press).
- 168- TURNER (M.W.) and ROWE (D.S.).
A naturally occurring fragment related to heavy chains of immunoglobulin G in normal human urine.
Nature, (1966), 210, 130.
- 169- TURNER (M.W.) and BENNICH (H.).
Subfragments from the Fc fragment of human immunoglobulin G.
Biochem. J. (1968), 107, 171.
- 170- TURNER (M.W.), MARTENSSON (L.), NATVIG (J.B.) and BENNICH (H).
Genetic (Gm) antigens associated with subfragments from the Fc fragment of human immunoglobulin G.
Nature, (1969), 221, 1166.
- 171- VAERMAN (J.P.) and HEREMANS (J.F.).
Subclasses of human immunoglobulin A based on differences in the alpha polypeptide chains.
Science, (1966), 153, 647.
- 172- VAN EIJK (H.G.), MONTFOORT (C.H.) and WESTENBRINK (H.G.K.).
Purification, analysis and properties of some Bence-Jones proteins.
Koninkl. Med. Akad. Wetenschap. Proc. Series C.(1963), 66, 363.
- 173- VAUGHAN (J.H.), JACOX (R.F.), GRAY (B.A.).
Light and heavy chain components of gamma globulins in urines of normal persons and patients with agammaglobulinemia.
J. Clin. Invest. (1967), 46, 266.

- 174 - WALDMANN (T.A.) and STROBER (W.).
Metabolism of immunoglobulins.
In Prog. Allergy. S. Karger. Basel p.1, 1969.
- 175- WANG (A.C.), WILSON (S.K.), HOPPER (J.E.), FUDENBERG (H.H.)
and NISONOFF (A.).
Evidence for control of synthesis of the variable regions of
the heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene.
Proc. Nat. Ac. Sci. (1970), 66, 337.
- 176 - WILLIAMSON (A.B.) and ASKONAS (B.A.).
Time course of labeling of light and heavy chains of immuno-
globulin G and the turn-over of the free light chain interme-
diate.
- 177- WOCHNER (R.D.), STROBER (W.) and WALDMANN (T.A.).
The role of the kidney in the catabolism of Bence-Jones
proteins and immunoglobulin fragments.
J. Exp. Med., (1967), 126, 207.
- 178 - WOCHNER (R.D.) and DEAN (R.).
Hypercatabolism of normal IgG an unexplained immunoglobulin
abnormality in the connective tissue diseases.
J. Clin. Invest. (1970), 49, 454.
- 179 - ZAWADZKI (Z.A.), BENEDEK (J.G.), EIN (D.) and EASTON (J.M.).
Rheumatoid arthritis terminating in heavy chain disease.
Ann. Inst. Med. (1969), 70, 335.
- 180 - ZILVERSMIT (D.B.), ENTENMAN (C.) and FISHLER (M.C.).
On the calculation of "turn-over time " and " turn-over rate"
from experiments involving the use of labeling agents.
J. Gen. Physiol. (1943), 26, 325.
- °
- ° °

VU :

Le Président de Thèse.

VU :

Le Doyen de la Faculté.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de PARIS.

